

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 23 March 1999 (23.03.99)	Applicant's or agent's file reference C 2055 PCT
International application No. PCT/EP98/04877	Priority date (day/month/year) 06 August 1997 (06.08.97)
International filing date (day/month/year) 05 August 1998 (05.08.98)	
Applicant ROHDE, Wolfgang et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

 in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

27 January 1999 (27.01.99)

 in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election was was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Jean-Marie McAdams
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 6 1 OCT 1999

PCT

REC'D 6 1 OCT 1999
PCT

T90

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Annehmers oder Anwalts C 2055 PCT	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/04877	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 05/08/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 06/08/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Annehmer MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ..et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Annehmer gemäß Artikel 36 übermittelt.								
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts. <input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT). Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.								
3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten: <table><tr><td>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</td></tr><tr><td>II <input type="checkbox"/> Priorität</td></tr><tr><td>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</td></tr><tr><td>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</td></tr><tr><td>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</td></tr><tr><td>VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</td></tr><tr><td>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</td></tr><tr><td>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</td></tr></table>	I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts	II <input type="checkbox"/> Priorität	III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit	IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung	V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung	VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen	VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung	VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung
I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts								
II <input type="checkbox"/> Priorität								
III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit								
IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung								
V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung								
VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen								
VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung								
VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung								

Datum der Einreichung des Antrags 27/01/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 29.09.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Knudsen, H Tel. Nr. +49 89 2399 8696
	

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/04877

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-24 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-15 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/14-14/14 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:
- Zeichnungen, Blatt:

3. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/04877

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 4-10,12,15 Nein: Ansprüche 1-3,11,13-14
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche Nein: Ansprüche 1-15
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-15 Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

PUNKT I:

1. Die am 11.12.1998 eingereichten Sequenzprotokolle sind nach der Internationalen Anmeldung eingereicht und werden daher nicht als Teil der Anmeldung angesehen.

PUNKT V:

Im diesem Prüfungsbericht werden die folgenden Dokumente erwähnt:

D1: JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING, Bd. 49, 1995, Seiten 179-186.
D2: JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING, Bd. 46, 1992, Seiten 391-394,

NEUHEIT:

2. D1 beschreibt ein Verfahren zur Genomanalyse von Kokosnuss Typen aus der ganzen Welt. Die Ergebnisse werden zur Ermittlung der Biodiversität und der genetischen Ähnlichkeit verwendet. Zur Analyse werden Primerpaare, die copia ähnliche Elemente amplifizieren, im PCR Verfahren eingesetzt. Die in D1 verwendeten Primers stammen aus dem durch EcoR1 ausgeschnittenen copia-ähnlichen Element und sollten daher, wie die in Anspruch 1 genannten Primers ubiquitär, bei Fingerprintanalysen einsetzbar sein.

Die Anmelderin argumentiert, daß D1 die mögliche ubiquitäre Anwendung der copia ähnlichen Elemente nicht offenbart. Jedoch behauptet die Anmelderin nicht, daß die in D1 offenbarten Primer nicht ubiquitär anwendbar sind. Da es kein Merkmal des Anspruchs 1 ist, daß die Primer tatsächlich ubiquitär angewendet werden, nur daß sie anwendbar sein müssen. Da es unumstritten ist, daß mit den in D1 offenbarten Primern ubiquitär Fingerprints erhältlich sind oder sich ableiten lassen, werden die Ansprüche 1-3, 11 und 13-14 als nicht neu gegenüber D1 angesehen.

ERFINDERISCHER TÄTIGKEIT:

3. Die in den Ansprüchen 4-8 genannten PCR-Verfahrensschritte sind für den Fachmann routinemäßig einsetzbar. Ihre Anwendung in dem in D1 offenbarten Verfahren beruht daher nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit.

4. Der nächstliegende Stand der Technik für die Ansprüche 9-10 und 12 ist D1, das eine im codia-ähnlichen Bereich durch Primers hergestellte Sequenz auflistet. Obwohl es aus D1 bekannt ist, daß die Primers, die diesen Bereich amplifizieren, beim Fingerprints der Kokosnuß Gattung einsetzbar sind, und es aus D2 bekannt ist, daß der codia-ähnliche Bereich mit dem copia Retrotransposon von Drosophila eine hohe Ähnlichkeit aufweist, war es für den Fachmann nicht ersichtlich, daß diese Primers ubiquitär bei Fingerprintanalysen einsetzbar sind. Eine erfinderische Tätigkeit kann daher für die Primers, die ubiquitär anwendbar sind, anerkannt werden.

In der Beschreibung wird nur der Primerpaar ISTR5/ISTR2 bei mehreren verschiedenen Tier- und Pflanzengattungen eingesetzt. Der Anmelder hat zwar eine Liste mit weiteren aus der in Tabelle 2 angegebenen Primerkombinationen, die bei Fingerprintanalysen von verschiedenen Spezies einsetzbar sind, eingereicht. Jedoch sind für einige Primer keine Daten vorhanden, die ihre ubiquitäre Einsetzbarkeit beschreiben und für diese Primer kann eine erfinderische Tätigkeit nicht anerkannt werden. Die Ansprüche 9, 10 und 12 werden daher nicht als erfinderisch angesehen.

5. Die Anwendung der Primers in der Kreuzungsarbeit mit Kokosnüssen ist in D1 vorgeschlagen. Es beruht daher nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit die Primers zum Nachweis von Rekombinationseignissen zu verwenden. Anspruch 15 wird daher als nicht erfinderisch angesehen.

GEWERBLICHE ANWENDBARKEIT:

6. Alle Ansprüche betreffen Primers oder deren Verwendung für in-vitro Verfahren und werden daher als gewerblich anwendbar angesehen.

PUNKT VI:

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
WO 97/28278	07.08.1998	313.01.1997	02.02.1996

7. Das obengenannte Dokument ist nach dem Prioritätstag aber vor dem Anmeldungstag der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht worden. Es ist daher nur für die Prüfung der Anspruchsgegenstände der vorliegenden Anmeldung, die kein gültiges Prioritätsrecht besitzen, relevant. In der regionalen Phase könnte das Dokument jedoch auch für die Neuheitsprüfung der ganzen Anmeldung von Bedeutung werden.

PUNKT VIII:

8. In Anspruch 1 wird die Verwendung aller Primers, die einen Teil eines copia oder copia-ähnlichen Elements kodieren, beansprucht. Durch die Vielzahl von copia-ähnlichen Elementen, die mit allerlei Mutationen in der Tier- und Pflanzenwelt existieren, ist es für den Fachmann kaum möglich, alle Sequenzen hinsichtlich einer möglichen Überlappung mit einer der Sequenzen, die in einem copia oder copia-ähnlichen Element enthalten sind, zu untersuchen. Der Anmelder argumentiert, daß der Anspruchsgegenstand auch durch die ubiquitären Fingerprintheigenschaften des Elements definiert ist.

Die Prüfungsbehörde ist der Auffassung, daß diese Eigenschaften so breit abgefaßt sind, daß es für den Fachmann eine nicht zuzumutende Aufgabe wäre auf alle Tier- und Pflanzenspezies sowie auf allen Mikroorganismen die Fingerprintheigenschaften des Primers zu testen. Die Anmelderin sieht auch diese Problematik ein, wenn sie erklärt, daß die ubiquitäre Anwendung aller in Tabelle 2 genannten Primers nicht vor der Antwortfrist getestet werden konnte. Die Prüfungsbehörde bleibt daher bei der Auffassung, daß Anspruch 1 so abgefaßt ist, daß der Fachmann dessen Schutzmfang mit zumutbarem Aufwand nicht festlegen kann. Anspruch 1 scheint daher gegen Artikel 6 PCT zu verstößen.

9. In den Ansprüchen 10 und 12 werden auch Primers, die mit den in den Tabellen 1 und 2 spezifisch angegebenen Primers überlappen, beansprucht. In der Beschreibung werden überlappende Sequenzen als alle Sequenzen definiert, die mit nur einer Nukleotid der spezifischen Primers überlappen. Aufgrund der hohen Zahl von copia-ähnlichen Elementen wird auch diese Formulierung als unklar angesehen.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

M

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference C 2055 PCT	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP98/04877	International filing date (day/month/year) 05 August 1998 (05.08.1998)	Priority date (day/month/year) 06 August 1997 (06.08.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 January 1999 (27.01.1999)	Date of completion of this report 29 September 1999 (29.09.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/04877

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages 1-24, as originally filed,

pages _____, filed with the demand,

pages _____, filed with the letter of _____,

pages _____, filed with the letter of _____.

the claims, Nos. 1-15, as originally filed,

Nos. _____, as amended under Article 19,

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. _____, filed with the letter of _____,

Nos. _____, filed with the letter of _____.

the drawings, sheets/fig 1/14 - 14/14, as originally filed,

sheets/fig _____, filed with the demand,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____

the claims, Nos. _____

the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

See Supplemental Box

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/04877

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

The sequence listings submitted on 11.12.1998 were submitted after the international application and therefore are not considered part of the application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/04877

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	4-10, 12, 15	YES
	Claims	1-3, 11, 13, 14	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-15	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents are referred to in this report:

D1: Journal of Genetics and Breeding, Vol. 49, 1995,
pages 179-186

D2: Journal of Genetics and Breeding, Vol. 46, 1992,
pages 391-394

NOVELTY:

1. Document D1 describes a method for genome analysis for use with types of coconut from all parts of the world. The results are used to establish biodiversity and genetic similarity. The analysis is carried out using primer pairs which amplify copia-like elements in a PCR process. The primers used in D1 come from the copia-like element extracted using EcoR1 and should therefore be universally applicable for fingerprint analysis in the same way as the primers specified in Claim 1 of the present application.

The applicant argues that D1 does not disclose the universal applicability of copia-like elements. However, the applicant does not maintain that the primers disclosed in D1 are not universally applicable. Claim 1 contains no feature stating that the primers are actually used

universally; it merely states that the primers must be usable. Since the fact that fingerprints can be obtained or derived universally using the primers disclosed in D1 is not disputed, Claims 1-3, 11, 13 and 14 are not considered to be novel over D1.

INVENTIVE STEP:

2. The steps of the PCR process defined in Claims 4-8 are routine measures for a person skilled in the art. Their use in the process disclosed in D1 therefore does not involve an inventive step.
3. The closest prior art for Claims 9, 10 and 12 is document D1, which lists a sequence produced by primers in the codia-like region. Although it is known from D1 that primers which amplify this region can be used for fingerprinting of all members of the coconut genus, and although it is known from D2 that the codia-like region exhibits a strong similarity to the copia retrotransposon from *Drosophila*, it is not obvious to a person skilled in the art that these primers are universally applicable in fingerprint analyses. It is therefore possible to acknowledge an inventive step for the universally applicable primers.

The description refers only to the primer pair ISTR5/ISTR2 in several different animal and plant genera. Although the applicant has submitted a list of further combinations of the primers specified in Table 2 which can be used in fingerprint analyses for various species, there are some primers for which no data is available to indicate universal applicability, and for these primers it is not possible to acknowledge an inventive step. Claims 9, 10 and 12 are therefore not considered inventive.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/04877

4. Since the use of these primers in hybridisation work involving coconuts is suggested in D1, the idea of using the said primers to prove the occurrence of recombination events does not involve an inventive step. Claim 15 is therefore not considered inventive.

INDUSTRIAL APPLICABILITY:

5. All the claims relate to primers or their use in *in vitro* processes and are therefore considered to be industrially applicable.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/04877

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO 97/28278	07 August 1998 (07.08.1998)	31 January 1997 (31.01.1997)	02 February 1996 (02.02.1996)

See Supplemental Box

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/04877

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

WO-A-97/28278 was published after the priority date but before the filing date of the present application. With respect to the present application it is therefore only relevant for the examination of the subject matter of those claims which do not have a valid right of priority. However, the said document may also become relevant with regard to the determination of novelty for the application as a whole in the regional phase.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claim 1 relates to the use of all primers which code for part of a copia or a copia-like element. In view of the large number of copia-like elements that exist with a wide variety of mutations in the plant and animal kingdoms, it is hardly possible for a person skilled in the art to check all the sequences to determine whether there is an overlap with one of the sequences contained in a copia or a copia-like element. The applicant maintains that the claimed subject matter is also defined by the universal fingerprinting properties of the element.

The examining authority considers the definition of these properties to be so broad that it would not be reasonable to expect a person skilled in the art to test the fingerprinting properties of the primer for all animal and plant species and all micro-organisms. The applicant also acknowledges this problem by stating that it was not possible to test the universal applicability of all the primers listed in Table 2 before the reply deadline. The examining authority therefore remains of the opinion that Claim 1 is formulated in such a way that a person skilled in the art would not be able to determine the scope of protection without going to unreasonable lengths. Claim 1 therefore appears to contravene PCT Article 6.

2. Claims 10 and 12 also relate to primers that overlap with those specifically named in Tables 1 and 2. The description defines an overlapping sequence as any sequence in which there is an overlap with only one nucleotide of a given primer. In view of the large number of copia-like elements, this formulation is also considered unclear.

VERTRAG FÜR DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts C 2055 PCT	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/ 04877	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 05/08/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 06/08/1997
Anmelder MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ... et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. **Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).
2. **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).
3. In der internationalen Anmeldung ist **ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde;
 - das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - dem jedoch keine Erklärung beigefügt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**
 - wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**
 - wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. _____

 - wie vom Anmelder vorgeschlagen
 - weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 - weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04877

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ROHDE W ET AL: "GENOME ANALYSIS OF COCOS NUCIFERA L. BY PCR AMPLIFICATION OF SPACERSEQUENCES SEPARATING A SUBSET OF COPIA-LIKE ECORI REPETITIVE ELEMENTS" JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING, Bd. 49, 1995, Seiten 179-186, XP000677744 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-15
X	ROHDE W ET AL: "AN ECORI REPETITIVE SEQUENCE FAMILY OF THE COCONUT PALM COCOS NUCIFERA L. SHOWS SEQUENCE HOMOLOGY TO COPIA-LIKE ELEMENTS" JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING, Bd. 46, 1992, Seiten 391-394, XP000677745 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,7,8, 10,11 -/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen
EP 98/04877

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WELSH J ET AL: "FINGERPRINTING GENOMES USING PCR WITH ARBITRARY PRIMERS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 18, Nr. 24, 25. Dezember 1990, Seiten 7213-7218, XP000310554 siehe das ganze Dokument ---	1-15
A	EP 0 443 748 A (UNIV SINGAPORE) 28. August 1991 ---	1-15
A	WO 93 08297 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 29. April 1993 ansprüche ---	1-15
P, X	WO 97 28278 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; ROHDE WOLFGANG (DE); BECKER DIETER (DE);) 7. August 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

EP 98/04877

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0443748 A	28-08-1991	AT 130047 T		15-11-1995
		AU 646655 B		03-03-1994
		AU 7027691 A		08-08-1991
		CA 2035813 A		07-08-1991
		DE 69114323 D		14-12-1995
		DE 69114323 T		18-04-1996
		US 5552275 A		03-09-1996
-----	-----	-----	-----	-----
WO 9308297 A	29-04-1993	AU 2931692 A		21-05-1993
		CA 2121696 A		29-04-1993
		EP 0610396 A		17-08-1994
		US 5691136 A		25-11-1997
		US 5523217 A		04-06-1996
-----	-----	-----	-----	-----
WO 9728278 A	07-08-1997	AU 1720497 A		22-08-1997
		EP 0879300 A		25-11-1998
-----	-----	-----	-----	-----

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04877

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ROHDE W ET AL: "GENOME ANALYSIS OF COCOS NUCIFERA L. BY PCR AMPLIFICATION OF SPACERSEQUENCES SEPARATING A SUBSET OF COPIA-LIKE ECORI REPETITIVE ELEMENTS" JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING, Bd. 49, 1995, Seiten 179-186, XP000677744 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-15
X	ROHDE W ET AL: "AN ECORI REPETITIVE SEQUENCE FAMILY OF THE COCONUT PALM COCOS NUCIFERA L. SHOWS SEQUENCE HOMOLOGY TO COPIA-LIKE ELEMENTS" JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING, Bd. 46, 1992, Seiten 391-394, XP000677745 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,7,8, 10,11 -/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

4. Februar 1999

11/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04877

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WELSH J ET AL: "FINGERPRINTING GENOMES USING PCR WITH ARBITRARY PRIMERS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 18, Nr. 24, 25. Dezember 1990, Seiten 7213-7218, XP000310554 siehe das ganze Dokument ---	1-15
A	EP 0 443 748 A (UNIV SINGAPORE) ✓ 28. August 1991 ---	1-15
A	WO 93 08297 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 29. April 1993 ansprüche ---	1-15
P,X	WO 97 28278 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; ROHDE WOLFGANG (DE); BECKER DIETER (DE);) 7. August 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04877

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0443748	A	28-08-1991	AT	130047 T	15-11-1995
			AU	646655 B	03-03-1994
			AU	7027691 A	08-08-1991
			CA	2035813 A	07-08-1991
			DE	69114323 D	14-12-1995
			DE	69114323 T	18-04-1996
			US	5552275 A	03-09-1996
WO 9308297	A	29-04-1993	AU	2931692 A	21-05-1993
			CA	2121696 A	29-04-1993
			EP	0610396 A	17-08-1994
			US	5691136 A	25-11-1997
			US	5523217 A	04-06-1996
WO 9728278	A	07-08-1997	AU	1720497 A	22-08-1997
			EP	0879300 A	25-11-1998

PCT

WORLD ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/07885 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Februar 1999 (18.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04877		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. August 1998 (05.08.98)		(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ROHDE, Wolfgang [DE/DE]; Untergasse 29, D-35418 Busek (DE). BECKER, Dieter [DE/DE]; Stuppstrasse 14, D-50823 Köln (DE). SALAMINI, Francesco [IT/DE]; Carl-von-Linné-Weg 1, D-50829 Köln (DE).	
(30) Prioritätsdaten: 97113601.5 6. August 1997 (06.08.97) EP		(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE).	
(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<p>(54) Title: THE USE OF PRIMERS FOR UNIVERSAL FINGERPRINT ANALYSIS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON PRIMERN FÜR UNIVERSELLE FINGERPRINT-ANALYSEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to the use of primers and primer pairs for DNA fingerprint analysis. According to the invention, finger prints can be obtained from people, animals, plants and micro-organisms with the primers and primer pairs. The invention also relates to the primers or primer pairs used for this purpose, and to kits containing the primers or primer pairs.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von Primern oder Primerpaaren zur DNA-Fingerprint-Analyse, wobei mit den Primern oder Primerpaaren Fingerprints sowohl vom Menschen, als auch von Tieren, als auch von Pflanzen und von Mikroorganismen erhältlich sind. Die Erfindung betrifft ferner Primer oder Primerpaare zur vorstehend genannten Verwendung sowie Kits, die die Primer bzw. Primerpaare enthalten.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verwendung von Primern für universelle Fingerprint-Analysen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Primern oder Primerpaaren zur DNA-Fingerprint-Analyse, wobei mit den Primern oder Primerpaaren Fingerprints sowohl vom Menschen, als auch von Tieren, als auch von Pflanzen als auch von Mikroorganismen erhältlich sind. Die Erfindung betrifft ferner Primer oder Primerpaare zur vorstehend genannten Verwendung sowie Kits, die die Primer bzw. Primerpaare enthalten.

Nachfolgend werden Dokumente aus dem Stand der Technik zitiert, deren Offenbarungsgehalt hiermit durch Bezugnahme in dieser Anmeldung enthalten ist.

Es ist allgemein bekannt, daß die Anwesenheit polymorpher und heterogen verteilter repetitiver Sequenzen wie Mikrosatelliten für genetische Analysen Verwendung findet.

Es ist auch allgemein bekannt, daß Retrotransposons wie die copia-Elemente aus *Drosophila* und copia-ähnliche Elemente in anderen Spezies des Tier- und Pflanzenreichs in der Regel als Mehrfach-Kopien in Genomen enthalten sind. Repetitive Genomsequenzen dieser Art sind am Beispiel copia-ähnlicher Elemente in *Pisum* (Erbse) zur genetischen Analyse dieser Pflanzenspezies benutzt worden (Lee u.a., Plant Mol. Biol. 15: 707-722, 1990). Diese von den Autoren als OFLP bezeichnete Methode basiert auf einem copia-spezifischen Primer und als zweitem Primer für die PCR-Amplifikation einer Sequenz aus dem diese Retrotransposons flankierenden Erbsengenom. Damit ist es möglich geworden, Erbsensorten durch PCR-Amplifikation bestimmter Elemente der Erbsen-copia-Familie zu amplifizieren und durch Auftrennung der nicht-radioaktiv markierten PCR-Produkte im Agarosegel auf Polymorphismen zu testen und genetische

Verwandtschaften zu bestimmen. Auch andere Retrotransposons, z.B. Tos1-1, Tos2-1 und Tos3-1 aus Reis haben als molekulare genetische Marker zur Differenzierung und Identifizierung von Reis-Kultivaren durch RFLP-Analyse Verwendung gefunden (Fukuchi u.a., Jap. J. Genetics, 68: 195-204, 1993), wobei aber auch hier postuliert wurde, daß für andere Pflanzenspezies deren endogene Retrotransposons als molekulare Marker isoliert werden. Eine andere Arbeit (Purugganan und Wessler, Mol. Ecology 4: 265-269, 1995) benutzt eine auf PCR basierende Methode, welche die Variation in Spaltstellen für Restriktionsenzyme auf transponierbaren Elementen für eine Fingerprint-Analyse ausnutzt. Allen diesen im Stand der Technik beschriebenen Verfahren ist jedoch gemeinsam, daß die dort beschriebenen genetischen Marker bzw. Primer nicht universell bei Menschen, Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen einsetzbar sind. Es liegt auf der Hand, daß die Bereitstellung derartiger genetischer Marker oder Primer in vielen Bereichen der modernen Biologie oder Medizin wesentliche Vorteile mit sich bringen würde. Ein entscheidender Schritt in diese Richtung wurde mit der bislang nicht veröffentlichten internationalen Patentanmeldung PCT/EP97/00442 getan. Dort wird die Verwendung von Primern zur Fingerprint-Analyse beschrieben, wobei die Primer an das copia-ähnliche Element aus der Kokusnuß hybridisieren. Erstmals konnten mit dieser Anmeldung Primer bzw. Primerpaare bereitgestellt werden, die sich zur Fingerprint-Analyse sowohl im Menschen, als auch in Tieren, wie auch in Pflanzen und Mikroorganismen eignen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war, die vorstehend beschriebenen Nachteile aus dem publizierten Stand der Technik zu überwinden und Wege und Mittel bereitzustellen, die eine möglichst universelle Anwendbarkeit von Primern bzw. genetischen Markern bei der Fingerprintanalyse von Arten sowohl aus dem Tier- als auch aus dem Pflanzenreich wie auch beim Menschen und bei Mikroorganismen gestatten. Hinsichtlich der PCT/EP97/00472 sollten weitere Bereiche innerhalb der copia-ähnlichen Elemente identifiziert werden, die eine besonders vorteilhafte Ableitung der Primer gestatten bzw. sollten weitere vorteilhafte Primer identifiziert werden.

Die Lösung dieser Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

Vom publizierten Stand der Technik aus gesehen wurde nämlich überraschenderweise gefunden, daß Primer, die mit dem nachstehend näher

gekennzeichneten Bereichen aus dem copia-ähnlichen Element aus der Kokosnuß (*Cocos nucifera L.*) hybridisieren, und dort eine Fingerprint-Analyse ermöglichen, auch bei vielen anderen Spezies aus dem Tier- und Pflanzenreich einschließlich der Hefe wie auch beim Menschen und sogar Mikroorganismen mit Erfolg eingesetzt werden können. Dieser Befund erlaubt die universelle Anwendbarkeit der genannten Primer zur Fingerprint-Analyse im gesamten Tier- und Pflanzenreich sowie beim Menschen und bei Mikroorganismen.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung eines Primers oder Primerpaars zur DNA-Fingerprint-Analyse, das dadurch gekennzeichnet ist, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint sowohl von Menschen, als auch von Tieren, als auch von Pflanzen als auch von Mikroorganismen erhältlich ist, und wobei der Primer oder das Primerpaar an DNA, die die Endonuclease, die Reverse Transcriptase oder die RNase H eines copia- oder copia-ähnlichen Elements insbesondere aus der Kokosnuß (*Cocos nucifera L.*) codiert, hybridisiert.

Erfindungsgemäß hybridisiert der Primer/das Primerpaar mit Organismen aus mindestens einer Spezies der vorstehend genannten taxonomischen Gruppen.

Dabei werden die in dieser Erfindung beschriebenen überraschenden Ergebnisse sowohl mit beliebigen Kombinationen unterschiedlicher Primer gegenläufiger Orientierung erreicht, die nur die Bedingung erfüllen müssen, daß sie an die vorstehend genannten DNAs hybridisieren, als auch unter Einsatz eines einzigen Primers, der aufgrund der Repetition des copia- oder copia-ähnlichen Elements, allerdings in 5'→3'/3'→5' Orientierung zweier benachbarter Elemente und nicht wie in Figur 2B dargestellt, in 5'→3'/5'→3'-Orientierung, ebenfalls die hochpolymorphen Fingerprints bereitstellt. Die vorstehend gewählte Begriffsbestimmung für die Primer schließt selbstverständlich ein, daß diese auch an DNAs anderer Organismen hybridisieren, sofern diese DNA-Sequenzen enthalten, die DNA-Sequenzen aus dem vorstehend genannten copia- oder copia-ähnlichen Element entsprechen.

Die Bedingungen, unter denen eine Hybridisierung der Primer und nachfolgende Amplifikation erfolgt, ist für den Fachmann ohne erfinderisches Bemühen aus dem Stand der Technik und dem nachfolgenden Beispielen ableitbar. Geeignete Bedingungen für die Hybridisierung der Primer und/oder der nachfolgenden Amplifikation können beispielsweise dem Lehrbuch Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989 (hiermit durch Bezugnahme enthalten) entnommen werden oder auch den nachfolgenden Beispielen.

Der Begriff "an DNA, die die Endonuclease, die Reverse Transcriptase oder die RNase H eines copia- oder copia-ähnlichen Elements insbesondere aus der Kokosnuß (*Cocos nucifera L.*) codiert, hybridisiert", bedeutet im Sinne dieser Erfindung, nicht nur, daß der Primer vollständig und in seiner gesamten Länge an diese DNA hybridisiert. Er bedeutet vielmehr auch, daß er an eine DNA hybridisiert, die mit der vorstehend definierten codierenden DNA überlappt. Dabei umfaßt der Überlappungsbereich mindestens 1 Nukleotid, vorzugsweise mindestens 5 Nukleotide und besonders bevorzugt mindestens 10 Nukleotide.

Die Länge der in dieser Erfindung verwendeten Primer beträgt vorzugsweise 15 bis 30 Nucleotide. Allerdings ist die Erfindung auch mit kürzeren oder mit längeren Primern durchführbar.

Der vorliegende Befund ist umso überraschender, als in der Regel im Stand der Technik davon ausgegangen worden ist, daß Primer lediglich in taxonomisch eng gesteckten Grenzen eingesetzt werden können, wenn aussagekräftige Fingerprints erhalten werden sollen.

Im Stand der Technik wurde von Rohde u.a. (J. Genet. & Breed., 46: 391-394, 1992) beschrieben, daß im Genom der Kokosnuß (*Cocos nucifera L.*) hochrepetitive Sequenzen mit Homologie zu auch in anderen Spezies beschriebenen copia-Elementen vorhanden sind, die nach Restriktion isolierter genomischer DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI und Auftrennung im Agarosegel als zwei, jeweils 1.3 und 1.4 Kilobasen große DNA-Banden sichtbar sind. Drei dieser "Ecorep" genannten DNA-Fragmente wurden nach Subklonierung sequenziert, und es konnten Sequenzunterschiede festgestellt werden. Versuche, diese Unterschiede für die genetische Analyse verschiedener Kokosnuß-Typen durch die Verwendung von Ecorep-Sequenzen als molekulare Sonde in RFLP-Analysen oder durch sequenzspezifische PCR-Primer auszunutzen, waren nicht erfolgreich (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 46: 391-394, 1992; Rohde, in: "La Recherche Europeene au Service du Cocotier - Actes du Seminaire - 8-10 septembre 1993, Montpellier". CIRAD (Collection: Colloques du CIRAD), Montpellier, S. 41-52).

Es wurde kürzlich für drei Kokosnuß-Typen gefunden, daß Subfamilien dieser 1.3 bzw. 1.4 Kilobasen großen Ecorep-Sequenzen existieren, in denen diese Elemente auf dem Kokosnuß-Genom nahe beinander liegen d.h. in tandem wiederholt sind, und in denen in der Regel zumindest eine der beiden von den früher

identifizierten Elementen (Rohde u.a., *J. Genet. & Breed.*, 46: 391-394, 1992) zu erwartenden EcoRI-Spaltstellen an den Enden der zunächst als "Spacer-Region" bezeichneten Sequenz fehlt (Rohde u.a., *J. Genet. & Breed.*, 49: 179-186, 1995). Diese Spacer-Region zeigt hohe Homologie zu dem copia-ähnlichen BARE-1-Element aus Gerste (Fig. 1A; Manninen und Schulman, *Plant. Mol. Biol.*, 22: 829-846, 1993). Bei dieser Subfamilie copia-ähnlicher Sequenzen im Kokosnuß-Genom handelt es sich daher um in tandem wiederholte Sequenzen, die Homologie zur Endonuclease- und Reversen Transkriptase/RNaseH-Region eines copia- bzw. copia-ähnlichen Elements aufweisen (siehe Fig. 1B). Die beobachteten Sequenzunterschiede in den Elementen dieser Subfamilie ließen sich jetzt - im Gegensatz zu den oben beschriebenen Versuchen für die EcoRep-Sequenzen - mit dem vorstehend beschriebenen, geeigneten PCR-Primern für die genetische Analyse in Kokosnuß ausnutzen. Dieses Verfahren zur Genomanalyse in Kokosnuß wurde als ISTR(inverse sequence-tagged repeat)-Analyse bezeichnet.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß diese Subfamilie mit hoher Sequenzkonservierung offensichtlich ubiquitär in der Pflanzen- und Tierwelt sowie beim Menschen und in Mikroorganismen vertreten ist, da die Verwendung der identischen ISTR-Primer (siehe auch Tabellen 1 und 2), wie sie auf der Basis der erfindungsgemäß ermittelten Kokosnußsequenzen entwickelt wurden, sowohl für andere Pflanzenspezies als auch für Tiere und den Menschen sowie den Mikroorganismen hochpolymorphe DNA-Fingerprints ergibt. Dabei lassen sich nicht nur eine Vielzahl von polymorphen Markern entdecken, die in der Nachkommenschaft segregieren ("single locus/multiple allele"-Marker), sondern es entstehen auch neue polymorphe Marker (Individuum-spezifische Marker), die z.B. in kontrollierten Kreuzungen (Beispiele Rind, Schaf) weder im Vater noch in der Mutter vorhanden sind und möglicherweise auf Rekombinationseignisse oder die Amplifikation bestimmter genomischer Bereiche zurückzuführen sind. Jeder Fingerprint ist folglich einzigartig für den individuellen Nachkommen bei identischen Eltern. Im Humanbereich konnte gezeigt werden, daß dies sogar für eineiige Zwillinge gilt, die für mehrere der verwendeten ISTR-Primer-Paare voneinander verschiedene Fingerprints zeigten (siehe Fig. 8).

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßigen Verwendung ist somit dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint mit DNAs aus dem gesamten Mikroorganismen-, Tier- und Pflanzenreich, umfassend

- (a) das Tierreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die Metazoen, darin enthalten die Unterstämme der Vertebraten, dabei vorzugsweise die Klasse der Säugetiere, darin enthalten insbesondere die Familie der Hominiden und die Familie der Bovidae, darin enthalten die Spezies *Bovis taurus* und *Ovis aries*, sowie alle Rassen und Varietäten, die sich aus den entsprechenden Spezies ableiten lassen;
- (b) das Pflanzenreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die der Mycobionta und Cormobionta, bei letzterer vorzugsweise die Abteilung der Spermatophyten, darin vorzugsweise die Klasse der Monocotyledonae mit ihren Familien der Areaceae und ihren Vertretern der Spezies *Cocos nucifera* oder der Familie der Poaceae mit ihren Vertretern der Spezies *Hordeum vulgare* und *Zea mays*, außerdem besonders bevorzugt die Klasse der Dicotyledonae mit ihren Familien, z.B. der Solanaceae und ihrem Vertreter der Spezies *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida*, oder z.B. die Familie der Brassicaceae mit ihrem Vertreter der Spezies *Brassica napus* oder die Familie der Chenopodiaceae mit ihrem Vertreter *Beta vulgaris* sowie alle Varietäten und Sorten, die sich von der entsprechenden Spezies ableiten lassen;
- (c) den Menschen; und
- (d) Mikroorganismen umfassend prokaryotische Mikroorganismen, dabei vorzugsweise Gram-positive Bakterien wie z.B. Milchsäurebakterien, Sarcina und Coryneforme Bakterien und Gram-negative Bakterien wie z.B. *Neisseria* und Enterobakterien, und eukaryotische Mikroorganismen umfassend Pilze, dabei vorzugsweise Phycomyceten wie z.B. *Phytophthora* und Ascomyceten wie z.B. Hefen

erhältlich ist.

Besonders vorteilhaft im Sinne der erfindungsgemäßen Verwendung ist, daß Fingerprints vergleichbarer Auflösung und Sensitivität mit DIG-markierten PCR-Produkten direkt im Gel ohne die generell in bekannter Weise vorgenommene Übertragung der DNA-Fragmente auf Membranen (Southern Blot) sichtbar gemacht wurden. Damit ist die Erstellung derartiger Fingerprints in einfachster Weise (Auf trennung der PCR-Fragmente im Sequenzgel, direkter Nachweis im Gel, Computer-unterstützte Datenanalyse durch direktes Einscannen der Sequenzgele) ohne die Verwendung von Radioaktivität ermöglicht worden.

Somit ist eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung dadurch gekennzeichnet, daß die zu analysierenden DNAs mit dem Primer oder dem Primerpaar durch PCR amplifiziert und nachfolgend der Größe nach auf einem Gel aufgetrennt werden.

Der Fachmann weiß aus dem Stand der Technik, wie er die Bedingungen für eine geeignete PCR auszuwählen hat. Auch Verfahren zur Auftrennung von PCR-amplifizierten DNAs auf einem Elektrophorese-Gel, das vorzugsweise ein Polyacrylamidgel ist, ist dem Stand der Technik zu entnehmen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Gel ein Sequenzgel. Die Herstellung von Sequenzgelen ist ebenfalls im Stand der Technik bekannt und beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet, daß als weiterer Schritt ein Southern Blot durchgeführt wird, und die auf die Membran übertragenen DNAs durch Hybridisierung mit einer Sonde sichtbar gemacht werden.

Diese Ausführungsform ist als Alternative zu den vorstehend beschriebenen beiden Ausführungsformen zu sehen. Sie erfordert zwar mehr Aufwand und den Umgang mit Radioaktivität, ist jedoch durchaus für Labors geeignet, die eine weniger aufwendige Laboreinrichtung betreiben, so z.B. keinen Scanner mit daran angeschlossenen Computer besitzen. Die Durchführung von Southern Blots sowie die Hybridisierungen mit einer geeigneten Sonde sind ebenfalls im Stand der Technik bekannt und beispielsweise in Sambrook et al., a.a.O., beschrieben.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist die Sonde der erfindungsgemäße Primer bzw. das erfindungsgemäße Primerpaar.

Da die Primer Bestandteil der amplifizierten DNA sind, ist durch sie in einfacher Weise auch ein Nachweis der Banden auf der für den Southern Blot verwendeten Membran möglich.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung trägt der Primer oder das Primerpaar eine Markierung.

In einer besonders bevorzugten Verwendung ist die Markierung eine nicht-radioaktive Markierung, insbesondere Digoxigenin, Biotin oder ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Farbstoff oder eine radioaktive Markierung, insbesondere ^{32}P .

Insbesondere die Markierung der Primer mit Digoxigenin und die Anfärbung nach Amplifikation der DNA und gelelektrophoretischer Auftrennung direkt im Gel kann von allen Labors oder interessierten Züchtern unter Einsatz eines geringen Geräteaufwands (PCR-Reaktion, Elektrophorese auf Sequenzgelen) und Verzicht auf Radioaktivität verwendet werden. Die Speicherung und Verarbeitung der Daten geschieht vorzugsweise durch direktes Einlesen des gefärbten und getrockneten Gels mittels Scanner in einen Computer. Weiterhin ist die Möglichkeit gegeben, durch Reisolierung von PCR-Produkten aus dem Sequenz-Gel, Reamplifikation und Sequenzierung spezifische Primer zu entwickeln, die allel-spezifische Amplifizierungsprodukte ergeben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der Primer eine der in Tabelle 2 angegebenen Sequenzen auf.

Diese Primer sind bevorzugte Beispiele der von den Erfindern in bisherigen DNA-Fingerprint-Analysen angewendeten Primer.

Ferner ist in der erfindungsgemäßen Verwendung besonders bevorzugt, daß der Primer eine Sequenz aufweist, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt. Dabei umfaßt der Überlappungsbereich mindestens 1 Nukleotid, vorzugsweise mindestens 5 Nukleotide und besonders bevorzugt mindestens 10 Nukleotide.

Die Sequenz dieser in der erfindungsgemäßen Verwendung einsetzbaren Primer kann nach Standardverfahren ermittelt werden, beispielsweise durch Sequenzierung der Sequenzen, die den in den Tabellen 1 und 2 dargestellten Oligonukleotidsequenzen in den copia- oder copia-ähnlichen Elementen benachbart sind.

Der Begriff "überlappende Sequenzen" umfaßt erfindungsgemäß auch Sequenzen, von denen die eine von einer anderen vollständig umfaßt ist. Zur Erläuterung sei dabei auf Tabelle 2 sowie Beispiel 9 verwiesen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet, daß die Fingerprint-Analyse für Biodiversitätsstudien, Studien zur genetischen Verwandtschaft, taxonomische Studien, und insbesondere in der Rechtsmedizin, der Züchtung, im Sortenschutz, im Genbank-

Management, in der Populationsgenetik und für Evolutionsstudien eingesetzt wird.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung Primer zur erfindungsgemäßen Verwendung, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Primer eine der in Tabelle 2 dargestellten Sequenzen aufweisen oder eine Sequenz, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt.

Ferner betrifft die Erfindung Kits, die mindestens 1 Primer und vorzugsweise mindestens 1 Primerpaar enthalten, der bzw. das an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisiert bzw. die vorstehend beschrieben wurden. Die Primer weisen vorzugsweise die in den Tabellen 1 und/oder 2 dargestellten Sequenzen oder damit überlappende Sequenzen auf. Die vorstehend Primer können in dem erfindungsgemäßen Kit in Behältern verpackt sein, beispielsweise in Gefäßen, gegebenenfalls in Puffern und/oder Lösungen. Falls angebracht können ein oder mehrere der Primer in ein und demselben Behälter verpackt werden. Die erfindungsgemäßen Kits können vielseitig eingesetzt werden. Beispielhafte Anwendungsbereiche wie die Züchtung wurden vorstehend angegeben.

Auch betrifft die Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Primer zur Herstellung der erfindungsgemäßen Kits. Die Herstellung der Kits selbst erfolgt vorzugsweise nach Standardverfahren.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung von Primern, die an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisieren, wobei die Primer vorzugsweise zu einer der vorstehend näher definierten Gruppen gehören, zu Nachweis von Rekombinationsereignissen bei Kreuzungen, insbesondere in der Tier- und Pflanzenzucht.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1: Bereich eines im Gerstengenom vorkommenden copia-ähnlichen Elements Bare-1 (Fig. 1A, aus Manninen und Schulman, Plant. Mol. Biol., 22: 829-846, 1993), der als in tandem wiederholte copia-ähnliche Sequenz (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995) im Genom der Kokosnuß (*Cocos nucifera* L.) gefunden wurde (Fig. 1B).

(A) Schematische Darstellung des copia-ähnlichen BARE-1-Elements aus Gerste.

ED: Endonuklease; RT: Reverse Transkriptase; RH: RNase H).

(B) Lage von repetitiven copia-ähnlichen Sequenzen aus der Kokosnuß relativ zu homologen Sequenzen auf dem Gersten-BARE-1-Element. Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Position der kürzlich gefundenen "Spacer-Region" (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995).

Fig. 2: Amplifikation der "Spacer-Region" zwischen benachbarten copia-ähnlichen Sequenzen im Kokosnuß-Genom (A) und ungefähre Position bisher verwendeter Primer für die ISTR-Analyse (B).

(A) Für die Amplifikation zur Klonierung und Sequenzierung der Regionen zwischen zwei benachbarten copia-ähnlichen Elementen der Kokosnuß wurden die Primerpaare ISTR5/ISTR-1 und ISTR5/ISTR-2 verwendet. Die Richtung der Pfeile symbolisiert die 5'→3'-Orientierung der verwendeten Oligodeoxynukleotide.

(B) Die einzelnen Primer sind in der Regel zwischen 18 und 20 Nukleotiden lang und wurden analog zur Sequenz des EcoRep1-Elements synthetisiert (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995). Die mit "-" versehenen Primer sind komplementär zur kodierenden Sequenz des copia-Elementes und können mit jedem beliebigen Primer der "plus"-Serie für die ISTR-Analyse kombiniert werden.

Fig. 3: ISTR-Analyse von Populationen am Beispiel der Kokosnuß (aus Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995).

(A) In den Spuren 1 bis 7 wurden einzelne Palmen einer East African Tall (EAT) Population durch ISTR-Analyse mit den Primerpaaren ISTR5/ISTR-2 (links) bzw. ISTR5/ISTR-1 (rechts) charakterisiert. In den Spuren 8 und 9 sind Kontrollanalysen einer einzelnen Rennell Island Tall(RLT)- oder Pemba Red Dwarf(PRD)-Palme aufgetragen.

(B) ISTR-Analyse zweier Malayan Yellow Dwarf(MYD)-Populationen aus Tanzania und den Philippinen mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2.

Fig. 4: Generelle Anwendung von ISTR-Primern im Pflanzenbereich.

DNA verschiedener Pflanzenspezies wurde einer Amplifikation mit den Primern ISTR5/ISTR-2 unterzogen. In den einzelnen Spuren wurden die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen:

1: Tabak, 2: Gerste, 3: Kartoffel, 4: Mais, 5: *Antirrhinum*, 6: *Arabidopsis*, 7: Raps, 8: *Craterostigma*, 9: Petunie, 10: Petersilie, 11: Sisal, 12: Milala-Palme, 13: *Borassus*-Palme, 14: Kokospalme, 15: Zuckerrübe, 16: *Cuphea*, 17: Hefe.

Fig. 5: ISTR-Analyse von einzelnen Angehörigen der Familie der Arecaceae (Palmae). DNAs von 17 verschiedenen Palmenarten wurden in einer Standard-PCR-Reaktion mit den Primern ISTR5/ISTR-2 amplifiziert und auf einem 4% PAGE-Gel aufgetrennt. In den einzelnen Spuren sind die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen: 1: *Hyphaene petersiana* Mart.; 2: *Bismarckia nobilis* Hildebrandt & H. Wendl.; 3: *Eugeissona utilis* Becc.; 4: *Korthalsia echinometra* Becc.; 5: *Mauritiella aculeata* (H.B. & K.) Burret; 6: *Nypa fruticans* Wurmb.; 7: *Pseudophoenix sargentii* H. Wendl. ex Sarg.; 8: *Oraniopsis appendiculata* (F.M.Bailey) J.Dransf., Irvine and N.W.Uhl; 9: *Socratea exorrhiza* (Mart.) H.Wendl.; 10: *Halmoorea tripatha* J. Dransf. & N.W.Uhl.; 11: *Cyrtostachys peekelianae* Becc.; 12: *Deckenia nobilis* H.Wendl.; 13: *Oncosperma tigillarium* (Jack) Ridley; 14: *Syagrus amara* (Jacq.f.) Mart.; 15: *Attalea allenii* H.E.Moore ex L.H.Bailey; 16: *Scheelea insignis* (Mart.) Karsten; 17: *Asterogyne martiana* (H.Wendl.) H.Wendl. ex Hemsley.

Fig. 6: ISTR-Analyse von Gerstensorten.

DNA von 35 verschiedenen Gersten-Genotypen wurden in einer Standard-PCR-Reaktion mit den Primern ISTR5/ISTR-2 amplifiziert und auf einem 4% PAGE-Gel aufgetrennt. In den einzelnen Spuren sind die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen: 1: Fiction; 2: Kaskade; 3: Red; 4: Georgie; 5: Alexis; 6: Marinka; 7: Flash; 8: Portikos; 9: Aura; 10: Gimpel; 11: Prisma; 12: Gitane; 13: Gavotte; 14: Manila; 15: Pilastro; 16: Masto; 17: Torrent; 17: Torrent; 18: Thibault; 19: Onice; 20: Mette; 21: Robur; 22: Probidor; 23: Tania; 24: Mario Otter; 25: Nico; 26: Magie; 27: Vogelsanger Gold; 28: Tekto 2002; 29: Asse; 30: Calcaroides-C15 (ex Bonus); 31: calcaroides-b2 (ex Bonus); 32: calcaroides-b19 (ex Bonus); 33: Bonus; 34: Christina; 35: Nudinka.

Fig. 7: Analyse einer Rinderfamilie (A) und zweier Schafsfamilien (B, C).
(A) Fünf Nachkommen sowie die beiden Eltern einer Rinderfamilie wurden einer ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2 unterzogen. V: Vater; M: Mutter. Die einzelnen Nachkommen sind numeriert. Der Pfeil deutet auf einen Marker, der nicht in allen Nachkommen auftritt.
(B, C) Analyse zweier Schafsfamilien mit Nachkommen einer Kreuzung zwischen dem identischen Vater und Mutter M1 (B) sowie Mutter M2 (C). Pfeile zeigen segregierende ISTR-Marker an; Sterne deuten auf individuum-spezifische Marker, die weder in den Eltern noch in den Geschwistern vorhanden sind.
GSM: Marker (untere Bande des Triplets), der mit der männlichen Geschlechtsausprägung kosegregiert. V: Vater. Die einzelnen Nachkommen der verschiedenen Züchtungen sind numeriert.

Fig. 8: Analyse dreier Menschenfamilien I, II und III mit verschiedenen Primerpaaren.
(A) ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-1. (B) ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-2. V: Kindvater; M: Mutter; SSM: sexspezifischer Marker. Die Nachkommen sind numeriert. Die beiden Nachkommen der Familien I und II sind eineiige Zwillinge.

Fig. 9: Figur 9 zeigt die DNA Analyse von Weinsorten. Für die ISTR-Fingerprint-Analyse wurde DNA aus 19 verschiedenen Weingenotypen mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2 einer PCR-Reaktion unterzogen. In den einzelnen Spuren wurden die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen:
1. Sangiovese piccolo precoce, 2. Sangiovese dell'Elba, 3. Sangiovese polveroso Bonechi, 4. Colorino americano, 5. Prugnolino medio, 6. Colorino del Valdarno, 7. Morellino, 8. Brunellone, 9. Sangiovese forte, 10. Sangiovese R10, 11. Saragiolo, 12. Colorino di Pisa, 13. Prugnolino dolce, 14. Morellino di Scansano, 15. Colorino di Lucca, 16. Giacchè, 17. Tinturiér, 18. Sangiovese polveroso, 19. Prugnolo gentile.

Fig. 10: Analyse von *Phytophthora palmivora*-Isolaten aus den Philippinen mit der Primer-Kombination ISTR5/ISTR-2

1: #P8704 (DRC089; Davao City, Mindanao); 2: #P8646 (DRC001; Davao Sur, Mindanao); 3: #P8652 (DRC007; Davao City, Mindanao); 4: #P8650 (DRC005; Davao City, Mindanao); 5: #P8698 (DRC082; Zamboanga, Mindanao); 6: #P8684 (DRC065; De Oro City, Mindanao); 7: #P8676 (DRC053; Davao City, Mindanao); 8: #P8653 (DRC008; Davao Norte, Mindanao); 9: #P8647 (DRC002; Davao Norte, Mindanao); 10: #P8649 (DRC004; Davao Norte, Mindanao); 11: #P8662; 12: #P8663 (DRC030; Davao Norte, Mindanao); 13: #P8667 (DRC036; South Cotabato, Mindanao); 14: #P8651 (DRC006; Davao Sur, Mindanao); 15: #P8674 (DRC047; Batangas, Luzon); 16: #P8660 (DRC025; Laguna, Luzon); 17: #P8705 (DRC090; Davao Norte, Mindanao); 18: #P8665 (DRC033; South Cotabato, Mindanao).
M: Kontroll-Reaktion mit DNA der MRD(Malayan Red Dwarf)-Kokospalme.

Fig. 11: ISTR-Analyse genomischer DNA mit den ISTR-Primerpaaren F6/B7 (Fig. 11A) und F21/B21 (Fig. 11B).

A. Die einzelnen Spuren sind DNA-Fingerprints folgender genomischer DNAs. 1: EAT (Kokusnuß); 2: PRD (Kokusnuß); 3: SRT (Kokusnuß); 4: Mensch; 5: Hamster; 6: Rostpilz.

B. Spur 1: EAT (Kokusnuß); 2: PRD (Kokusnuß); 3: SRT (Kokusnuß); 4: Mensch; 5: Raps; 6: Gerste.

Die angegebenen Zahlenwerte über den Spuren entsprechen den in der Standard-PCR-Reaktion gewählten "annealing"-Temperaturen.

Fig. 12. ISTR-Analyse von verschiedenen Isolaten des Rostpilzen *Puccinia recondita* f.sp. *secalis* mit der Primerkombination F6/B3 (siehe Tabelle 2).

DNA von verschiedenen Rostpilzisolaten wurden in einer Standard PCR-Reaktion mit den Primern F6/B3 (siehe Tabelle 2) amplifiziert und auf einem 4%igen Page-Gel aufgetrennt.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Nachweis von Längenpolymorphismen bei der Kokosnuß

Für diesen Versuch, der in Fig. 3 dargestellt ist, wurden die Primerpaare ISTR5/ISTR-2 und ISTR5/ISTR-1 (siehe Tabelle 1) verwendet. Als zu untersuchende DNAs werden die genomischen DNAs von einzelnen Palmen aus Populationen von East African Tall (EAT) und Malayan Yellow Dwarf (MYD) sowie je einer einzelnen Palme Rennel Island Tall (RLT) und Pemba Red Dwarf (PRD) verwendet. Die betreffenden Oligodeoxynukleotide (Primer) wurden mit Hilfe der Polynukleotidkinase in bekannter Weise an ihrem Ende mit ^{32}P radioaktiv markiert und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Diese wird standardmäßig in einem Volumen von 20 μl durchgeführt und enthält je 1 pmol der Primer und 25 ng der zu amplifizierenden genomischen DNA in 1x PCR-Reaktionspuffer (z.B. der Firma GIBCO/BRL), 2.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP (Deoxynukleosid-Triphosphate), und 1 Einheit Taq-DNA-Polymerase. Das Gemisch wird zunächst für 3 Min. bei 95°C denaturiert und danach werden insgesamt 40 Zyklen von 95°C (30 Sekunden, Denaturierung), 45°C (30 Sekunden, Anlagerung) und 72°C (2 Minuten, Synthese) durchgeführt. Die Reaktion wird durch einen Syntheseschritt (72°C für 10 Minuten) beendet, 10 μl Farbstoffgemisch (in Formamid) hinzugefügt und nach erneutem Erhitzen 3 μl davon auf einem 4% Polyacrylamid-Sequenzgel aufgetrennt. Das Gel wird nach Trennen der beiden Glasplatten in bekannter Weise an einer der Sequenz-Glasplatten getrocknet und die aufgetrennten radioaktiv markierten PCR-Produkte durch Belichten eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Wie aus Fig. 3 hervorgeht, sind eine Reihe von DNA-Produkten allen Palmen gemein, aber es sind in beiden Populationen auch Unterschiede in einzelnen Palmen zu beobachten. Dies ist weniger überraschend für den "Tall"-Typ EAT (Fig. 3A), da für diese Kokosnuß-Typen Fremdbefruchtung im Feld beobachtet worden ist. Überraschenderweise entdeckt die ISTR-Analyse jedoch auch im allgemeinhin als autogam geltenden "Dwarf"-Palmentyp wie MYD Unterschiede innerhalb der Populationen sowie auch Unterschiede zwischen den Populationen aus Tanzania und den Philippinen (Fig. 3B). Mit bisher verwendeten RFLP-Markern konnten Unterschiede in Dwarf-Populationen nicht nachgewiesen wer-

den. Darüberhinaus ist ersichtlich, daß die Verwendung des Primerpaars ISTR5/ISTR-1 nicht nur - wie von der Lage des ISTR-1-Primers erwartet (Fig. 2B) - etwa 100 bp kleinere PCR-Produkte ergibt, sondern auch neue Polymorphismen verursacht. Die Ursache hierfür kann nur vermutet werden, aber dieser Befund eröffnet die Möglichkeit, basierend auf den ermittelten copia-ähnlichen Sequenzen der Kokosnuss alle denkbaren copia-ähnlichen Sequenzen und Primerkombinationen für die ISTR-Analyse einzusetzen. Dieses einfache Experiment zeigt daher eindrucksvoll, wie bereits mit Hilfe einer einzigen PCR-Amplifikation unter Verwendung des identischen Primerpaars eine reproduzierbare Fingerprintanalyse einzelner Palmen und Aussagen zur genetischen Homogenität von Populationen ermöglicht werden. Dieses experimentelle Protokoll ist für alle ISTR-Primer anwendbar und wurde, wenn nicht anders angegeben, auch für die nachfolgenden Beispiele benutzt.

Tabelle 1

Beispiele verwendeter Oligodesoxynukleotide (ISTR-Primer) für die ISTR-Analyse

ISTR-Primer Sequenz (5'→3')

Vorwärtsprimer

ISTR1 AGG AGG TGA ATA CCT TAG

ISTR2 AAA ATG GCA TAG TCT CTC

ISTR3 GTC GAC ATG CCA TCT TTC

ISTR4 TAT AGT ACC TAT TGG GTG

ISTR5 ATA TAT GGA CTT AAG CAA GC

ISTR6 GTA TTG TAC GTG GAT GAC ATC

ISTR7 CAA CAG TGC TCC CAC TGA

ISTR7' TGC TAG GAC TTT CAC AGA

Rückwärtsprimer

ISTR-1 TTT TCT ACT TCA TGT CTG A

ISTR-2 AAT AAA TCG ATC ATC GAC

ISTR-3 ATT CCC ATC TGC ACC AAT

ISTR-4 ATG TCA TCC ACG TAC AAT

ISTR-5 CTT CTG TGA AAG TCC TAG

Beispiel 2

Test auf generelle Anwendung bei Pflanzen

Um die Möglichkeit zu ergründen, die Kokosnuss-spezifischen ISTR-Primer generell in Pflanzen für den Nachweis von DNA-Polymorphismen in copia-ähnlichen Sequenzen anzuwenden, wurden in dem in Beispiel 2 durchgeföhrten Versuch die genomischen DNAs verschiedener Pflanzen mit dem ISTR-Primerpaar ISTR5/ISTR-2 in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Aus Fig. 4 ist ersichtlich, daß von Tabak- bis zu Hefe-DNA alle eingesetzten DNAs durch Kokosnuss-spezifische Primer individuelle PCR-Produkte ergeben. Ähnliche Versuche wurden auch mit anderen ISTR-Primerkombinationen durchgeföhr. Dies zeigt, daß ähnliche wie die für Kokosnuss beschriebenen Familien von benachbart gelegenen copia-ähnlichen repetitiven Elementen in niederen und höheren Pflanzen existieren und für eine Fingerprintanalyse zugänglich sind. Als Konsequenz ist die ISTR-Analyse daher über die in Beispiel 1 für eine einzelne Pflanzenspezies gezeigte Möglichkeit hinaus anwendbar für die Charakterisierung genetischer Diversität und das Erfassen pflanzengenetischer Resourcen, entweder in Genbanken oder durch in situ-Konservierung.

Beispiel 3

Test auf Anwendung innerhalb einer Pflanzenfamilie am Beispiel der Palmen (Arecaceae)

Die mögliche Anwendung der ISTR-Analyse zu taxonomischen Studien wurde mit Hilfe des ISTR-Primerpaars ISTR5/ISTR-2 an Pflanzenspezies der Familie Arecaceae (Palmae) durchgeführt. Dazu wurden DNAs von 17 Palmenarten (siehe Legende zu Fig. 5) in einer PCR-Reaktion mit den erwähnten Primern amplifiziert und die PCR-Produkte in bekannter Weise analysiert. Wie aus Fig. 5 ersichtlich, wird für jede Palme ein unterschiedlicher Fingerprint erhalten, der es ermöglicht, die Daten durch Computer-unterstützte Auswertung einer entsprechenden Matrix zur Ermittlung biologischer Diversität durch die Erstellung von Dendrogrammen nach üblichen Verfahren zu verarbeiten. Für die praktische Anwendung ist zum Beispiel von Bedeutung, welche genetische Verwandtschaft etwa zwischen den bedeutenden Ölplanten der Öl- und der Kokosnuss-Palme existieren. Genetische Marker etwa für das für die Ölausbeute bedeutsame Merkmal der Nußschalen-dicke könnten dann in beiden Spezies für die Züchtung Anwendung finden, wenn diese genetisch hochverwandt sind.

Beispiel 4

Test auf Anwendung bei gezüchteten Sorten am Beispiel der Gerste

Die Charakterisierung von gezüchteten Sorten durch Fingerprintanalyse mit Hilfe der ISTR-Technologie wurde am Beispiel von Gerstensorten getestet. Fig. 6 zeigt eine PAGE-Analyse von PCR-Produkten, die für insgesamt 35 Varietäten bzw. Genotypen erhalten wurde. Die hohe genetische Verwandtschaft der untersuchten Hochleistungssorten ist aus der hohen Anzahl von monomorphen DNA-Fragmenten ersichtlich. Dennoch konnten allein aus dieser einen Analyse insgesamt 44 polymorphe Marker identifiziert werden, die vor allem im oberen Bereich des Sequenzgels gelegen waren. Diese Marker wurden in einer Matrix angeordnet und daraus nach der UPGMA-Methode ein Dendrogramm ermittelt. Die Tatsache, daß die Sorte Bonus (Spur 33) nicht von calcaroides-b19 (Spur 32) zu unterscheiden ist, ist nicht weiter verwunderlich, da dieser Genotyp eine in Bonus erzeugte rezessive Mutante ist. Dies gilt allerdings auch für die Genotypen Calca-

roides-C15 (Spur 30) und calcaroides-b2 (Spur 31), die durch Mutagenese im selben genetischen Hintergrund erzeugt worden waren. Allerdings wurden hier für die Mutagenese Neutronen-(Calcaroides-C15) bzw. Röntgenstrahlen (calcaroides-b2) als Mutagene verwendet, die auf chromosomaler Ebene in der Regel zu Deletionen und Inversionen führen, während calcaroides-b19 aus Bonus durch Natriumazid-Behandlung erhalten wurde, die Punktmutationen hervorruft. Dieses Beispiel erläutert daher einmal, daß die ISTR-Analyse Hinweise auf Umordnungen des genetischen Materials zu geben vermag. Zweitens ist allein aus der Verwendung eines einzigen ISTR-Primerpaars eine Fingerprintanalyse von Hochleistungssorten möglich. Daraus folgt, daß mit der Verwendung weiterer ISTR-Primerpaare ein eindeutiger sortenspezifischer Fingerprint erhalten werden kann, der als biochemische Charakterisierung der Sorte dient (Sortenschutz).

Beispiel 5

Test auf Anwendung bei Tieren: Evidenz für segregierende sowie neu entstehende Marker in Familien

Zum Test auf die generelle Anwendbarkeit der ISTR-Analyse genetischen Materials außerhalb des Pflanzenreichs wurden Tierfamilien untersucht, bei denen der Vater durch kontrollierte Züchtung (in vitro-Fertilisation) bekannt war. Fig. 7 illustriert eine ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2 an einer Rinderfamilie (Fig. 7A) und an zwei Schaffamilien mit identischem Vater, aber zwei verschiedenen Müttern M1 (Fig. 7B) und M2 (Fig. 7C). Aus beiden Analysen ist ersichtlich, daß 1) Kokosnuss-spezifische ISTR-Primer auch im Tierreich zur Fingerprintanalyse angewendet werden können, und daß 2) sowohl segregierende Marker (siehe Pfeile in Fig. 7C) als auch Individuum-spezifische Marker (siehe Sterne in Fig. 7) durch die ISTR-Analyse zugänglich sind. Einen Hinweis, daß segregierende ISTR-Marker mit wichtigen Phänotypen cosegregieren können, gibt die mit SSM (sexspezifischer Marker) bezeichnete DNA-Bande des prominenten Triplets in Fig. 7B, C: Diese Bande ist im Vater, nicht jedoch in den beiden Müttern vorhanden. Tatsächlich sind die beiden Nachkommen der Familie 1 (Fig. 7B) weiblichen Geschlechts, während die Familie 2 (Fig. 7C) einen männlichen Nachkommen hat. Die Tatsache, daß elterliche Marker nicht in allen Nachkommen vorhanden sind (siehe Pfeil in Fig. 7A) bzw. daß neue Marker entstehen

(siehe Sterne in Fig. 7), kann als Hinweis interpretiert werden, daß die ISTR-Analyse Rekombinationsergebnisse bei Kreuzungen entdecken kann.

Beispiel 6

Test auf Anwendung beim Menschen: Evidenz für geschlechts- und Individuum-spezifische Polymorphismen

Dieses Beispiel erläutert die Anwendung der ISTR-Analyse im humanen Bereich. Dazu wurden drei Familien I, II und III analysiert, wobei die beiden Kinder der Familien I und II jeweils homozygote (eineiige) Zwillinge waren. Da von vornherein nicht zu erwarten war, daß ISTR-Primer DNA-Polymorphismen bei eineiigen Zwillingen entdecken können (hochpolymorphe Mikrosatellitenprimer zeigen keine Unterschiede; Haas, Institut für Rechtsmedizin, Universität Giessen; persönliche Mitteilung), wurden 6 verschiedene ISTR-Primerpaare getestet. Bei allen 6 Analysen sind DNA-Polymorphismen sichtbar, und zwei der ISTR-Analysen mit den Primerpaaren ISTR6/ISTR-1 und ISTR6/ISTR-2 sind in Fig. 8 dargestellt. Die Analyse mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-1 (Fig. 8A) ist bemerkenswert für die Vielzahl von polymorphen DNA-Banden, die Individuum-spezifisch sind und selbst bei den beiden Paaren von eineiigen Zwillingen der Familien I und II eine eindeutige Charakterisierung des individuellen Menschen zulassen. Dies trifft ebenfalls für die in Fig. 8B mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-2 durchgeführte ISTR-Analyse zu, auch wenn die Anzahl der polymorphen Banden geringer ist. Bemerkenswerterweise findet sich hier unter den neuen Polymorphismen eine DNA-Bande (SSM in Fig. 8B), die nur in den drei Vätern, nicht jedoch in den drei Müttern und den fünf Kindern auftritt. Tatsächlich könnte es sich hier, wie im Beispiel 5 für die Schaffamilien erwähnt, um einen geschlechtsspezifischen Marker handeln, da alle 5 Kinder weiblichen Geschlechts sind und somit eine strikt geschlechtsspezifische Segregation bei insgesamt 11 Individuen gegeben ist.

Beispiel 7

Nachweis von ISTR-Fingerprints bei Wein

Für diesen Versuch, der in Figur 9 dargestellt ist, wurde das Primerpaar ISTR5/ISTR-2 (siehe Tabelle 1) verwendet. Als zu untersuchende DNAs wurden die genomischen DNAs von 19 *Vitis vinifera* L. Pflanzen einschließlich 13 vermuteter "Sangiovese" Genotypen und 6 "gefärbte" Ecotypen verwendet, deren Früchte von Bedeutung für die intensive Rotfärbung des Weines sind. Aus Figur 9 ist ersichtlich, daß eine große Anzahl polymorpher DNA-Fragmente erhalten wurde. Obwohl die Variabilität am größten in den "gefärbten" Ecotypen ist, konnte die ISTR-Analyse außerdem einen hohen Anteil von Polymorphismen in den "Sangiovese"-Genotypen feststellen. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf die polyclonale Herkunft vieler Weinkultivare zurückzuführen. Daher zeigt auch dieses Beispiel, daß die ISTR-Analyse eine effiziente und sensitive Methode für die Untersuchung der genetischen Diversität innerhalb von Ecotypen und für die Identifizierung von einzelnen Clonen einsetzbar ist.

Beispiel 8

Anwendung des ISTR-Fingerprints bei Mikroorganismen

Als Beispiel für die Anwendung der ISTR-Technologie auf Mikroorganismen dienten Isolate des Pilz *Phytophthora palmivora*, der auf Kokospalmen lethale Erkrankungen ("bud rot") hervorruft. Es wurde hier ein besonders diffiziles Beispiel für die Anwendung einer DNA-Marker-Technologie gewählt, für das eigentlich aufgrund der begrenzten genetischen Diversität nur wenige Polymorphismen erwartet wurden, da es sich in allen Fällen um *P. palmivora*-Isolate handelte, die zudem ausschließlich in den Philippinen isoliert wurden und auch hier überwiegend lokal begrenzt waren (die Isolate stammten vorwiegend von der Insel Mindanao).

Es wurden je 1 µg DNA von achtzehn *P. palmivora*-Isolaten aus den Philippinen in einer Standard-PCR-Reaktion mit der Primer-Kombination ISTR5/ISTR-2 amplifiziert, die Produkte in bekannter Weise durch PAGE auf einem 4%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die einzelnen Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Fig. 10 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Bereits durch die Gelanalyse (Fig. 10A) werden mit einer einzigen ISTR-Primer-Kombination eine Fülle polymorpher DNA-Fragmente sichtbar. Dreißig dieser Banden wurden nach bekannten Verfahren der Cluster-Analyse ausgewertet zu Phenogrammen nach

der UPGMA-Methode (SAHN-Clustering; Fig. 10B) und durch PCA (principal coordinate analysis; Fig. 10C). Die erhaltenen Daten stimmen gut mit der anhand von RAPD-DNA-Marker-Analysen vorgenommenen Klassifizierung dieser Isolate überein.

Beispiel 9

Spezifität der ISTR-Analyse bei überlappenden Primer-Paaren

Die nachstehend genannten und in Tabelle 2 aufgeführten Oligodesoxynukleotide (Primer) wurden mit Hilfe der Polynukleotidkinase in bekannter Weise an ihrem Ende mit ^{32}P radioaktiv markiert und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Diese wurde standardgemäß in einem Volumen von 20 μl durchgeführt und enthielt je 1 pmol der Primer und 25 ng der zu amplifizierenden genomischen DNA in 1x PCR-Reaktionspuffer (z.B. der Firma GIBCO/BRL), 2.5 mM MgCl_2 , 0.25 mM dNTPs (Desoxynukleosid-Triphosphate), und 1 Einheit Taq-DNA-Polymerase. Das Gemisch wurde zunächst für 3 Min. bei 95°C denaturiert. Danach wurden insgesamt 40 Zyklen von 95°C (30 Sekunden, Denaturierung), 50°C bzw. wie in der Legende zu Fig. 11 angegeben (30 Sekunden, Anlagerung oder "annealing") und 72°C (2 Minuten Synthese) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch einen Syntheseschritt (72°C für 10 Minuten) beendet, 10 μl übliches Farbstoffgemisch (in Formamid) hinzugefügt und nach erneutem Erhitzen 3 μl davon auf einem 4% Polyacrylamid-Sequenzgel aufgetrennt. Das Gel wurde nach Trennen der beiden Glasplatten in bekannter Weise an einer der Sequenz-Glasplatten getrocknet und die aufgetrennten radioaktiv markierten PCR-Produkte durch Belichten eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Dieses experimentelle Protokoll ist für alle ISTR-Primer anwendbar und wurde, wenn nicht anders angegeben, auch für die nachfolgenden Beispiele benutzt.

Tabelle 2

PCR-Primer für die ISTR-Analyse mit F(forward)- und B(backward)-Primern

Vorwärtsprimer

F1	AGG AGG TGA ATA CCT TAG
F2	TTT TCT ACT TCA TGT CTG AAT
F3	AAA ATG GCA TAG TCT CTC
F4	GTC GAC ATG CCA TCT TTC
F5	TAT AGT ACC TAT TGG GTG
F6	ATA TAT GGA CTT AAG CAA GC
F7	GTA TTG TAC GTG GAT GAC ATC C
F8	CAA CAG CGC TCC CAC TGA
F9	TGC TAG GAC TTT CAC AGA
F10	CAA CAG TGC TCC CAC TGA
F11	TAA TAG TGC TCC CAT TGA TCT
F12	TTG GAC AAC CAT ATT TTG ACT
F13	ATA TGG ACT TAA GCA AGC CA
F14	ACC CTT TTC TAC TTC ATG TCT
F15	GAT CAA AAA GTT TGG TTT CAT
F16	TAG AGT TTT CCA TAC TAA ACC
F17	GCT CGG TAC CCA TAT ATG G
F18	CAT ATT GGC GTT CAT GGA G
F19	TCC ATG AAA GAC CTA GGT GA
F20	AGT ATG GAA AAC TCT AAG AGG
F21	ATA TAT GGA CTT AAG CAA GCA TCT CGG AGC

Rückwärtsprimer

B1	TTT TCT ACT TCA TGT CTG AAT
B2	AAT AAA TCG ATC ATC GAC TC
B3	GGA TAT CCT ATG AAT CAA GC
B4	ATT CCC ATC TGC ACC AAT
B5	ATG TCA TCC ACG TAC AAT
B6	CTT CTG TGA AAG TCC TAG
B7	AAT CGT GTA TCT TCA AAA AAG
B8	ATA TAT GGA CTT AAG CAA GCA
B9	GGA ATA TCA TTC CCA ATA AG
B10	CCT CCT TAT TGG GAA TGA TAT
B11	GAA ACG AGT GTT CCA GTT C
B12	GAC CCT TTT GAA AAC ACA TG
B13	TCT TGG AGT TGG AAC ACT C



B14 GTT TCA ATG ATG TGA TCA AAA A
B15 GGG TAT TAA TCC CCT CCT AG
B16 AAA CCT AGC GGC TAT TCC AT
B17 GGC TAC AAT AGC ATG CAA TG
B18 CAG AGT TGA TAT CTG ATA TCG
B19 CCT CTA TAT CCT TTG AAA TAG
B20 CAC ATT GTG ATC TTC TAT AAT
B21 AAT AAA TCG ATC ATC GAC TCT AAA GGA CCT

Im angeführten Beispiel der Temperaturabhängigkeit der PCR-Amplifikation während der ISTR-Analyse wurden 2 Primerpaare verwendet, die i) überlappen (F6 mit F21 sowie B7 mit B21; siehe Tabelle 2) und ii) sich durch die Länge unterscheiden:

- i) Überlappende Primer
- A) ISTR-Primerpaar F6(20mer)/B7(21mer)
- B) ISTR-Primerpaar F21(30mer)/B21(30mer)

Die gesamte Sequenz der Primer F6 und B7 ist in den Primern F21 bzw. B21 enthalten. Die in Fig. 11A und B gezeigten Ergebnisse belegen, daß auch überlappende Primer für die ISTR-Analyse benutzt werden können und zu voneinander verschiedenen DNA-Fingerprints führen (jeweils Spuren 1-3).

ii) Temperaturabhängigkeit der ISTR-Analyse

Die Spezifität der ISTR-Primer gegenüber den sogenannten "arbitrary primers" (beliebig primende Oligodesoxynukleotide), wie sie von J. Welsh und M. McClelland in "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers", Nucleic Acids Res., 18:7213-7218 (1990) beschrieben worden sind, wurde durch die Temperaturabhängigkeit der PCR-Reaktion gezeigt. Während die von Welsh und McClelland beschriebenen Primer selbst bis zu einer Länge von 34 Nukleotiden keine PCR-Amplifikation bei 52 Grad "annealing"-Temperatur mehr ergaben (op. cit., s. 7215), zeigte die ISTR-Analyse mit den 30mer-ISTR-Primern sogar bei einer "annealing"-Temperatur von 72 Grad sowohl im homologen (Kokusnuß) als auch im heterologen System (Mensch, Raps, Gerste) diskrete und reproduzierbare Fingerprints (Fig. 11B). Wie auf der Basis der Lehre diese Anmeldung für die Länge der gewählten Primer im ISTR-Primerpaar F6(20mer)/B7(21mer) nicht anders zu erwarten, erhielt man bei einer "annealing"-

Temperatur von 55 Grad noch eine gute Amplifikation, nicht dagegen bei 60 Grad (Fig. 11A).

Beispiel 10

Nachweis von ISTR-Fingerprints bei verschiedenen Isolaten des Rostpilz *Puccinia recondita* f.sp. *secalis*

Als ein weiteres Beispiel der Anwendung der ISTR-Technologie auf Mikroorganismen dienten verschiedene Isolate des Rostpilz *Puccinia recondita* f.sp. *secalis*. In diesem Versuch, der in Figur 12 dargestellt ist, wurde DNA aus Einzelpustel-Isolaten des Rostpilzes isoliert und das Primerpaar F6/B3 (siehe Tabelle 2) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde wie in Beispiel 8 beschrieben durchgeführt, und die Produkte nach an sich bekannter Weise durch PAGE auf einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die einzelnen Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Wie Figur 12 zeigt, wird wiederum mit einer einzigen ISTR-Primerkombination eine Fülle polymorpher DNA-Fragmente erzeugt, durch die sich die verschiedenen Rostpilzisolate unterscheiden lassen. Daher ist dieses Experiment ein weiterer Beleg für die Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen ISTR-Technologie bei Mikroorganismen.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Primers oder Primerpaars zur DNA-Fingerprint-Analyse, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint sowohl von Menschen, als auch von Tieren, als auch von Pflanzen als auch von Mikroorganismen erhältlich ist, und wobei der Primer oder das Primerpaar an DNA, die die Endonuclease, die Reverse Transcriptase oder die RNase H eines copia- oder copia-ähnlichen Elements insbesondere aus der Kokosnuß (Cocos nucifera L.) codiert, hybridisiert.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint mit DNAs aus dem gesamten Tier- und Pflanzenreich, umfassend
 - (a) das Tierreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die Metazoen, darin enthalten die Unterstämme der Vertebraten, dabei vorzugsweise die Klasse der Säugetiere, darin enthalten insbesondere die Familie der Hominiden und die Familie der Bovidae, darin enthalten die Spezies Bovis taurus und Ovis aries, sowie alle Rassen und Varietäten, die sich aus der entsprechenden Spezies ableiten lassen;
 - (b) das Pflanzenreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die der Mycobionta und Cormobionta, bei letzterer vorzugsweise die Abteilung der Spermatophyten, darin vorzugsweise die Klasse der Monocotyledonae mit ihren Familien der Areaceae und ihren Vertretern der Spezies Cocos nucifera oder der Familie der Poaceae mit ihren Vertretern der Spezies Hordeum vulgare und Zea mays, außerdem besonders bevorzugt die Klasse der Dicotyledonae mit ihren Familien, z.B. der Solaneceae und ihrem Vertreter der Spezies Solanum tuberosum, Nicotiana tabacum, Petunia hybrida, oder z.B. die Familie der Brassicaceae mit ihrem Vertreter der Spezies Brassica napus oder die Familie der Chenopodiaceae mit ihrem Vertreter Beta vulgaris sowie alle Varietäten und Sorten, die sich von der entsprechenden Spezies ableiten lassen;
 - (c) den Menschen; und



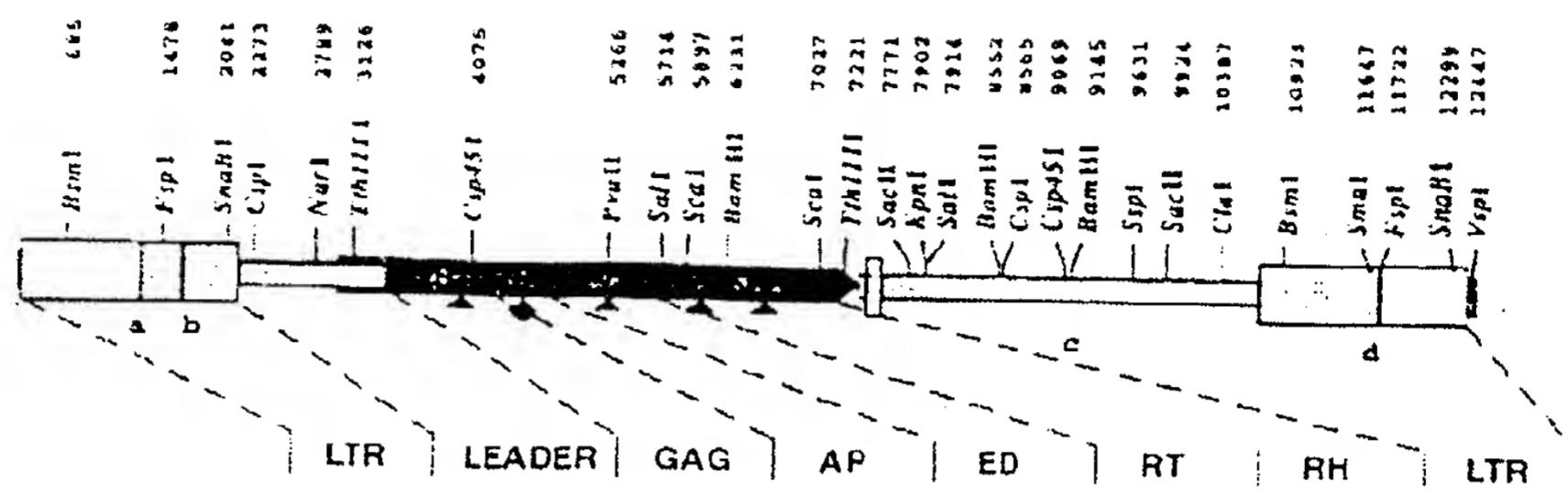
(d) Mikroorganismen umfassend prokaryotische Mikroorganismen, dabei vorzugsweise Gram-positive Bakterien wie z.B. Milchsäurebakterien, Sarcina und Coryneforme Bakterien und Gram-negative Bakterien wie z.B. Neisseria und Enterobakterien, und eukaryotische Mikroorganismen umfassend Pilze, dabei vorzugsweise Phycomyceten wie z.B. Phytophthora und Ascomyceten wie z.B. Hefen
erhältlich ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die zu analysierenden DNAs mit dem Primer oder dem Primerpaar durch PCR amplifiziert und nachfolgend der Größe nach auf einem Gel aufgetrennt werden.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Gel ein Sequenzgel ist.
5. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß als weiterer Schritt ein Southern Blot durchgeführt wird, und die auf die Membran übertragenen DNAs durch Hybridisierung mit einer Sonde sichtbar gemacht werden.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde der bzw. das in einem der vorstehenden Ansprüche genannte Primer oder Primerpaar ist.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer oder das Primerpaar eine Markierung trägt.
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine nicht-radioaktive Markierung, insbesondere Digoxigenin, Biotin, ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Farbstoff oder eine radioaktive Markierung, insbesondere ^{32}P ist.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer eine der in Tabelle 2 dargestellten Sequenzen aufweist.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer eine Sequenz aufweist, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Fingerprint-Analyse für Biodiversitätsstudien, Studien zur genetischen Verwandtschaft, taxonomische Studien, und insbesondere in der Rechtsmedizin, der Züchtung, im Sortenschutz, im Genbank-Management, in der Diagnostik, in der Populationsgenetik oder für Evolutionsstudien eingesetzt wird.
12. Primer zur Verwendung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer eine der in Tabelle 2 dargestellten Sequenzen aufweist oder eine Sequenz aufweist, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt.
13. Kit enthaltend mindestens einen Primer und vorzugsweise mindestens ein Primerpaar, der bzw. das an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisiert oder der/das in einem der Ansprüche 1 bis 12 gekennzeichnet ist.
14. Verwendung von mindestens einem Primer und vorzugsweise mindestens ein Primerpaar, der/das in einem der Ansprüche 1 bis 12 gekennzeichnet ist zur Herstellung eines Kits nach Anspruch 13.
15. Verwendung eines Primers oder Primerpaars, der bzw. das an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisiert zum Nachweis von Rekombinationsereignissen bei Kreuzungen, insbesonders in der Tier- und Pflanzenzüchtung.

1/14

A



B

COPIA-ÄHNLICHE KOKOSNUSS-SEQUENZ

FIG. 1

2/14

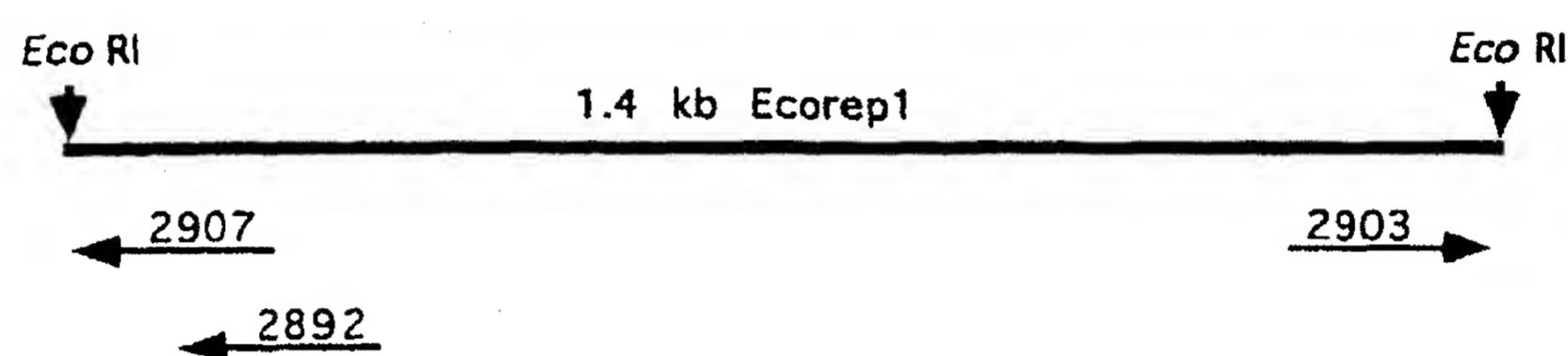
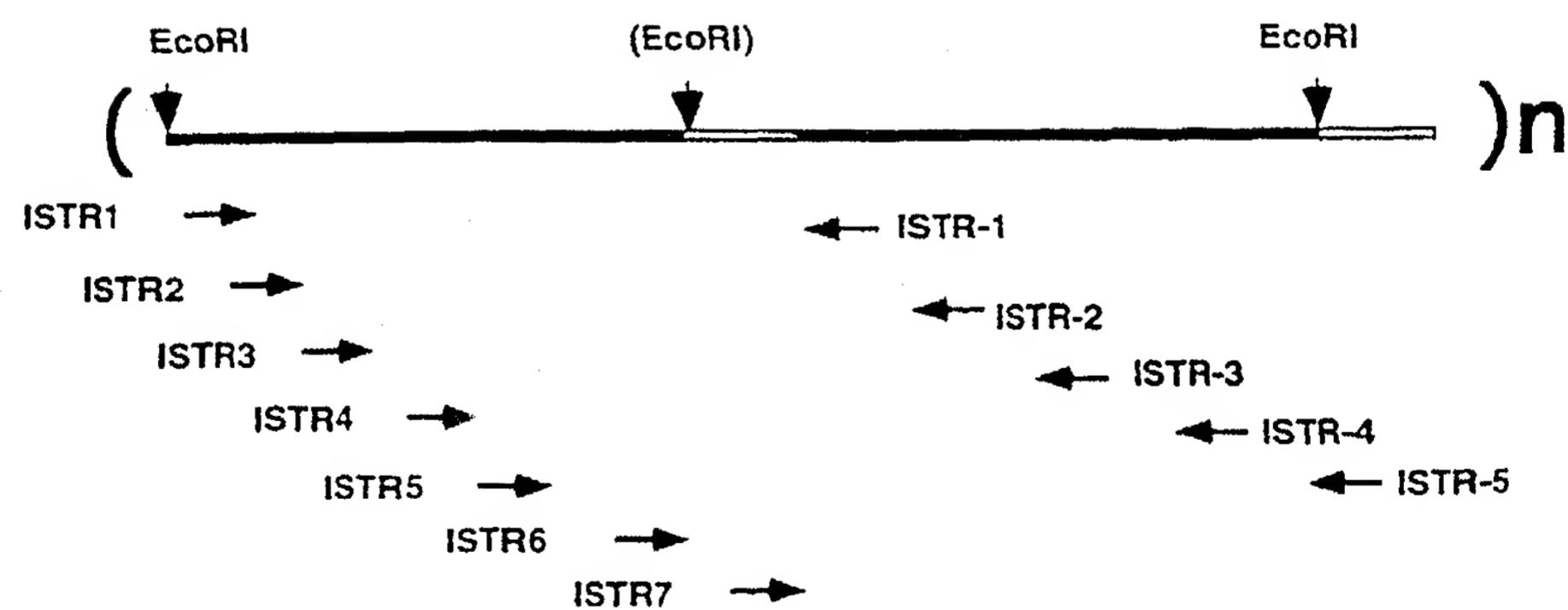
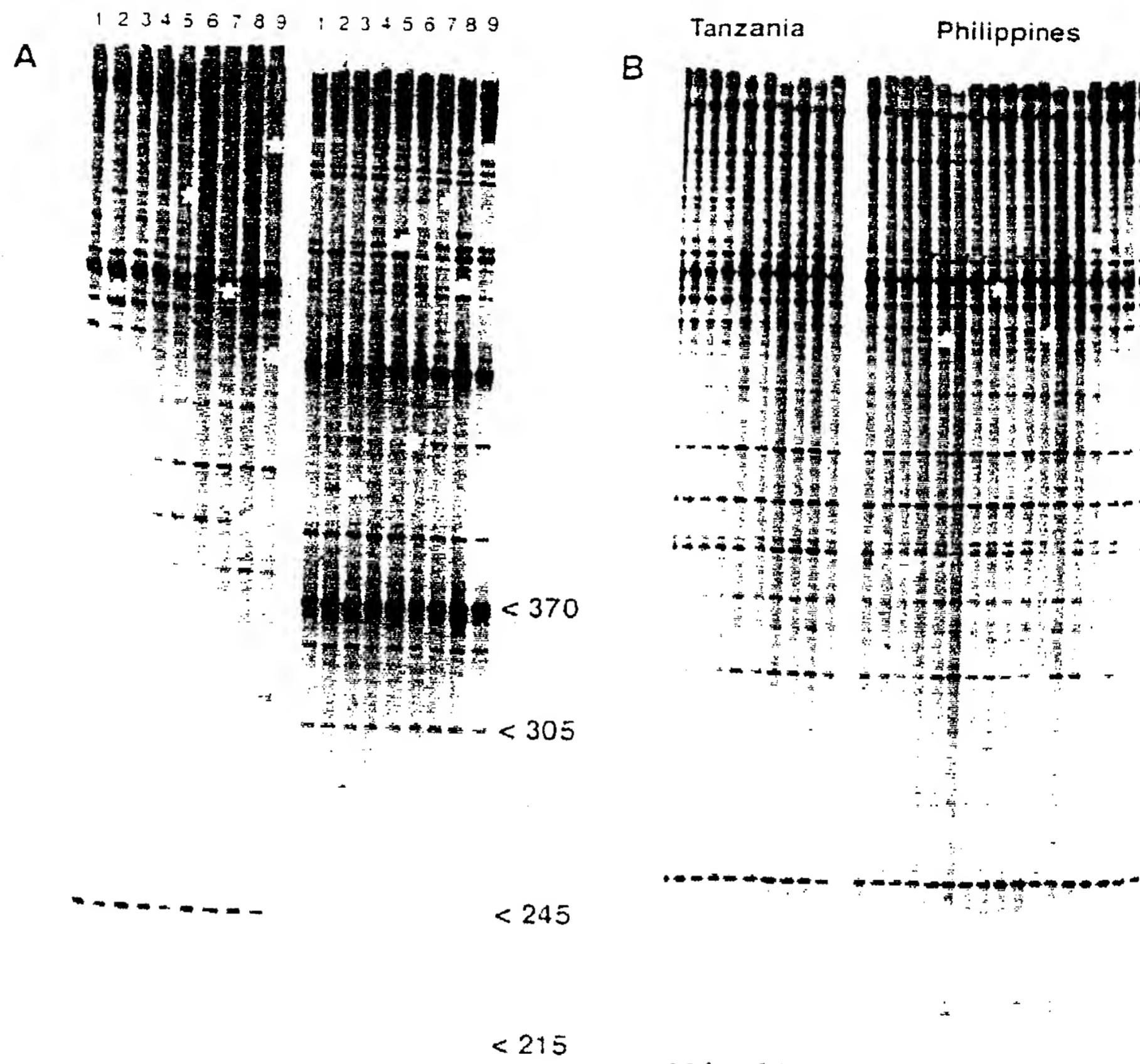
A**B**

FIG. 2

3/14

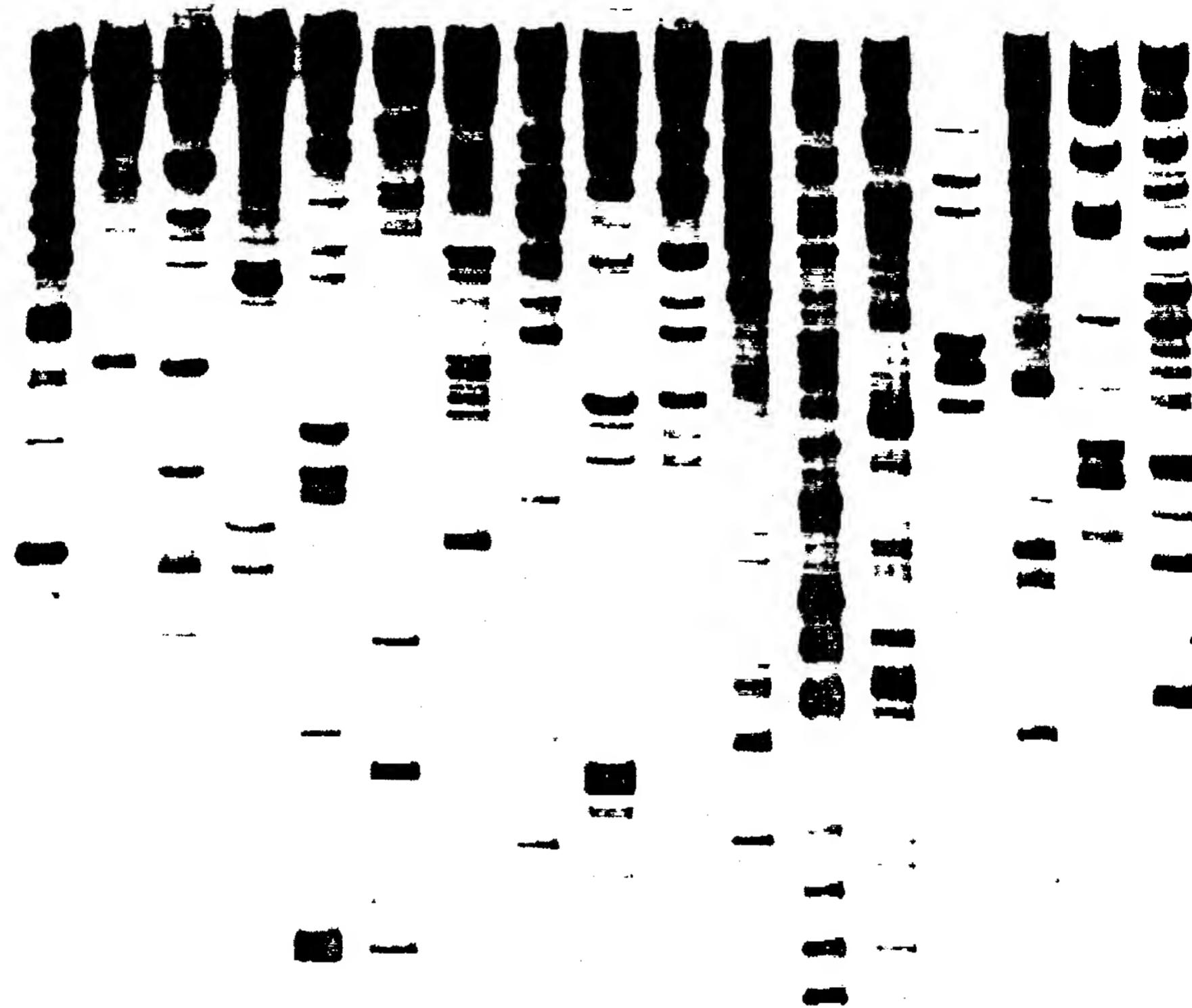
FIG. 3



4/14

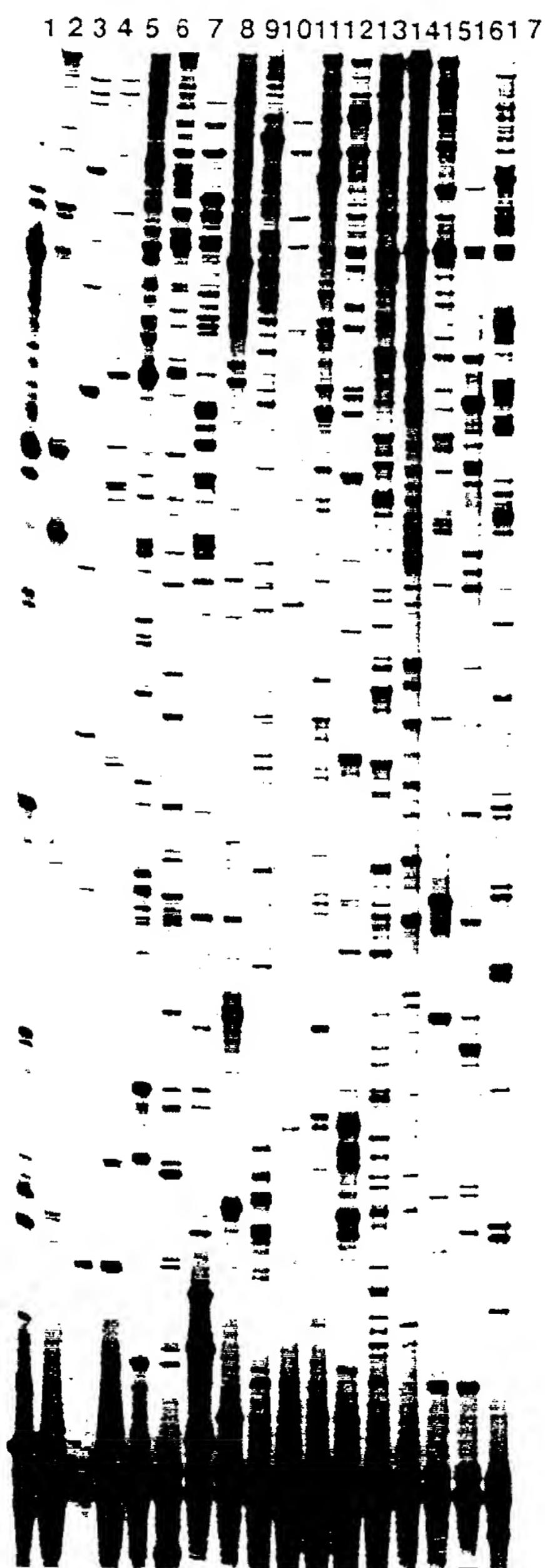
FIG. 4

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



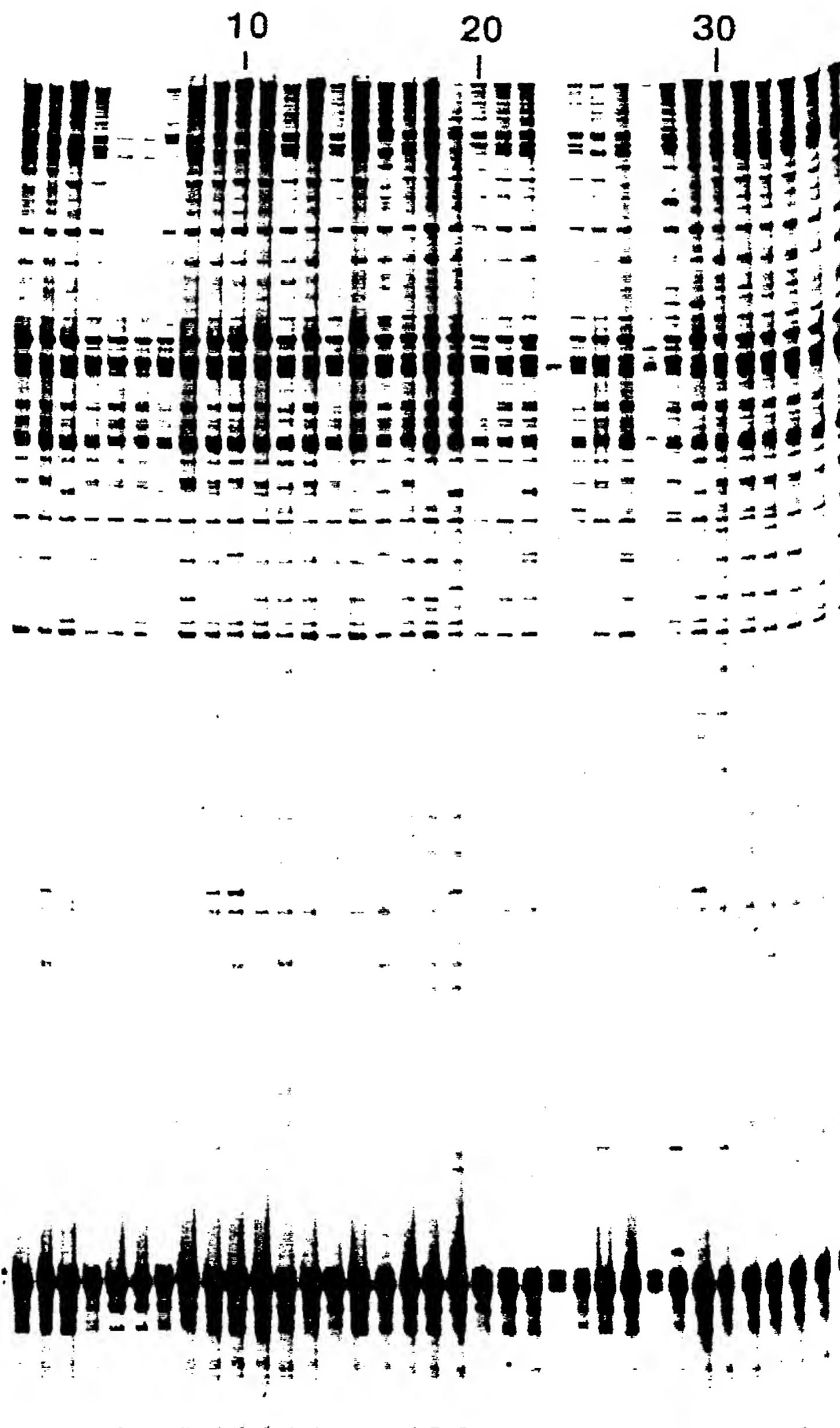
5/14

FIG. 5



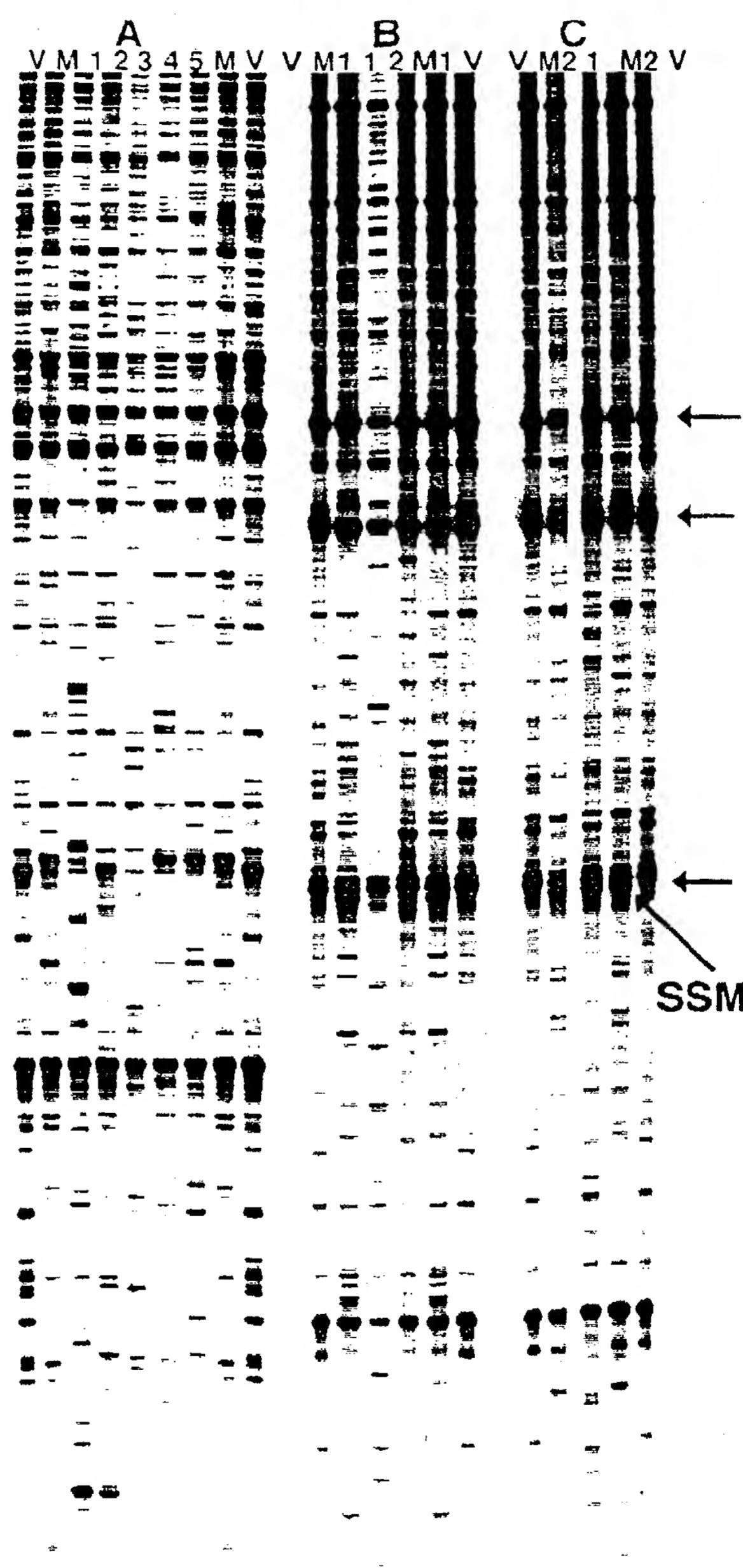
6/14

FIG. 6



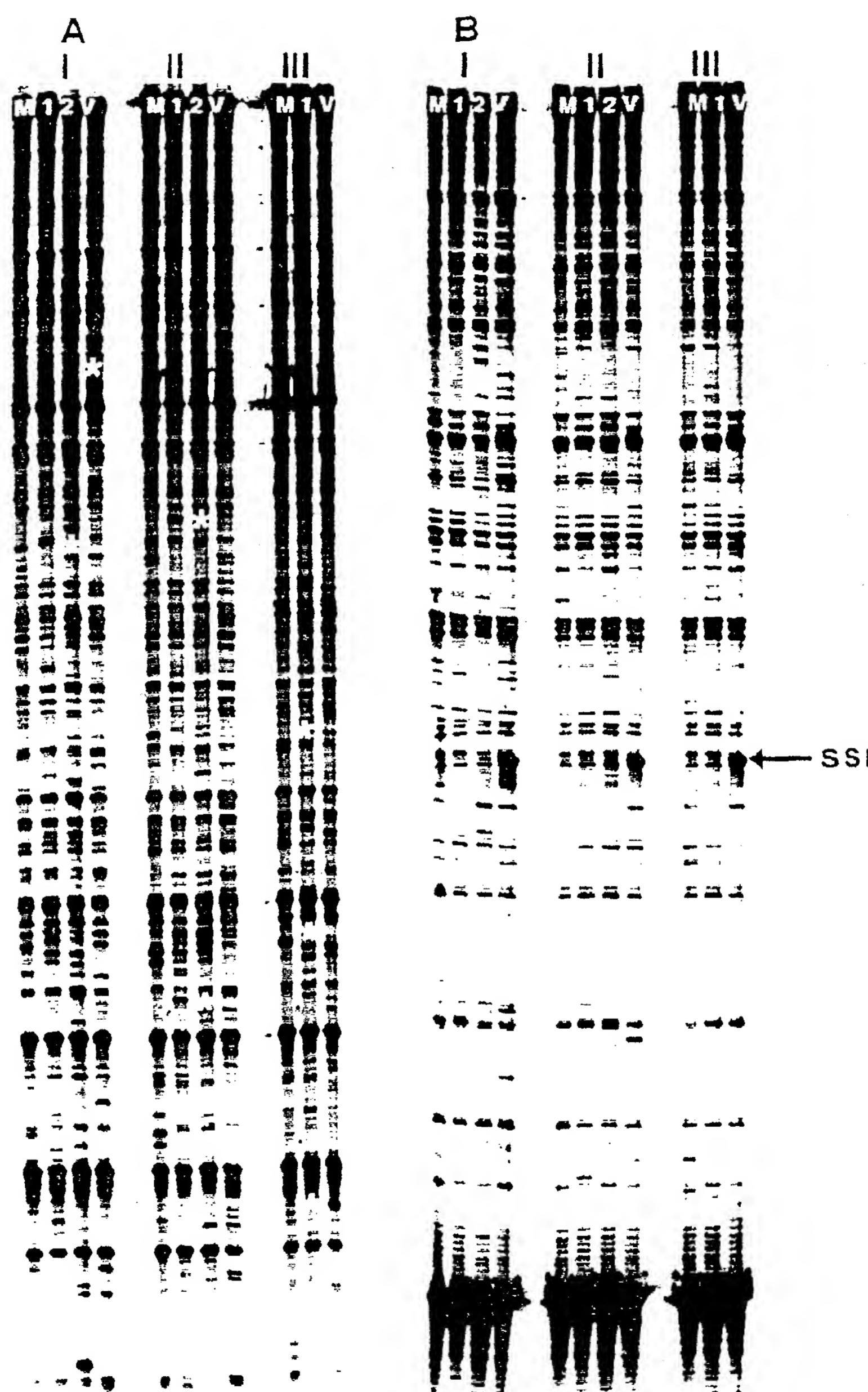
7/14

FIG. 7



8/14

FIG. 3



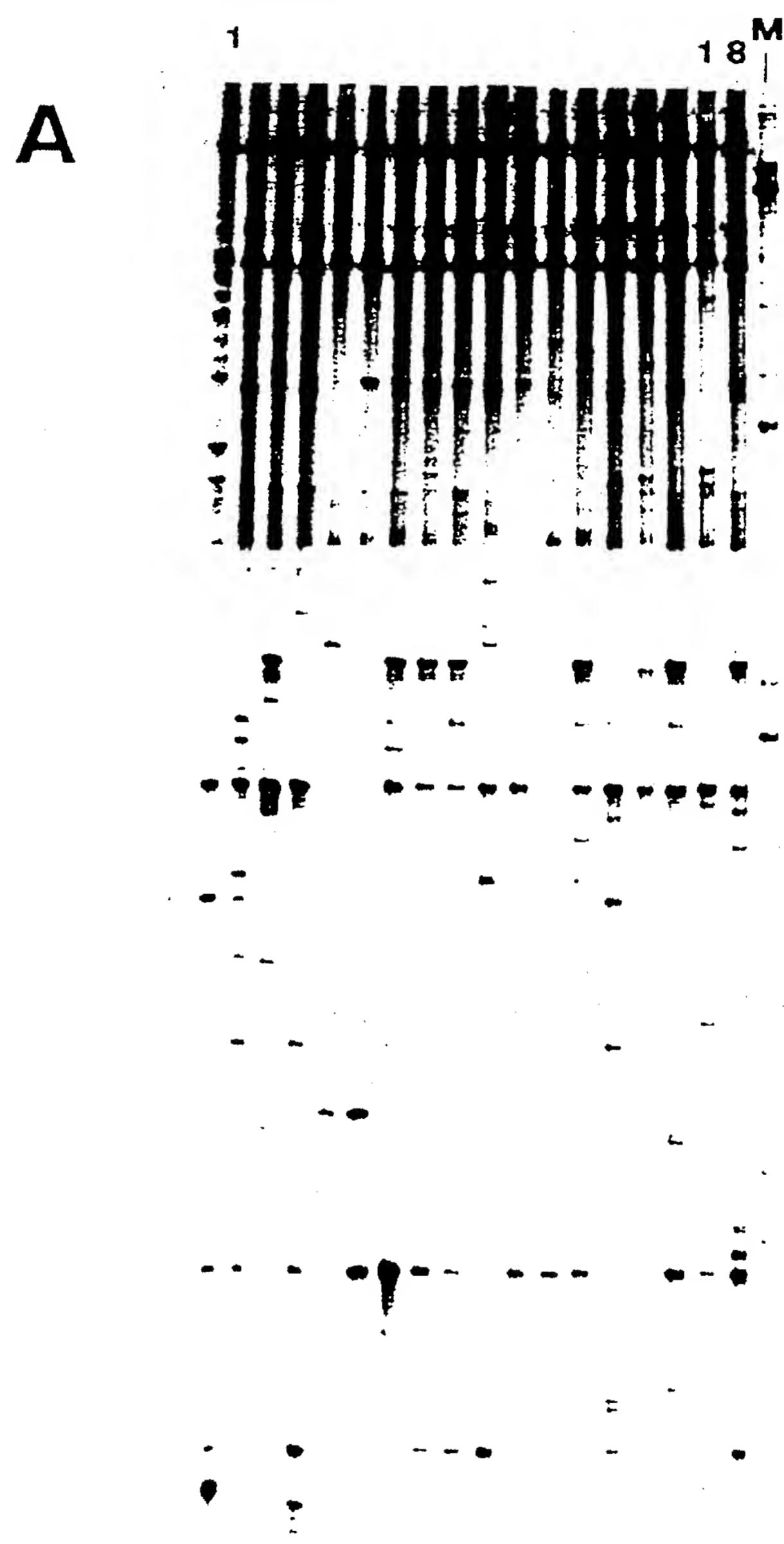
9/14

FIG. 9



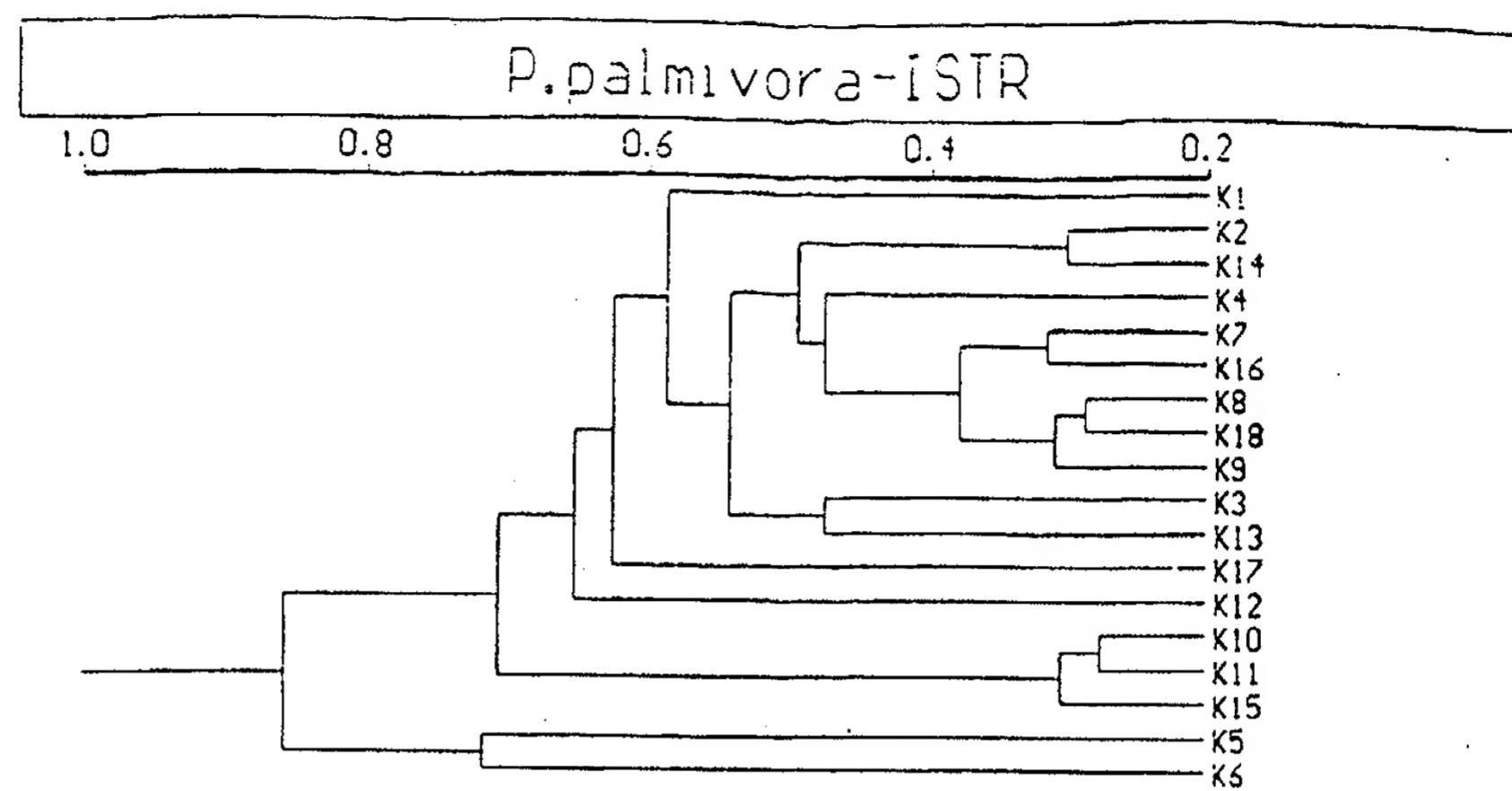
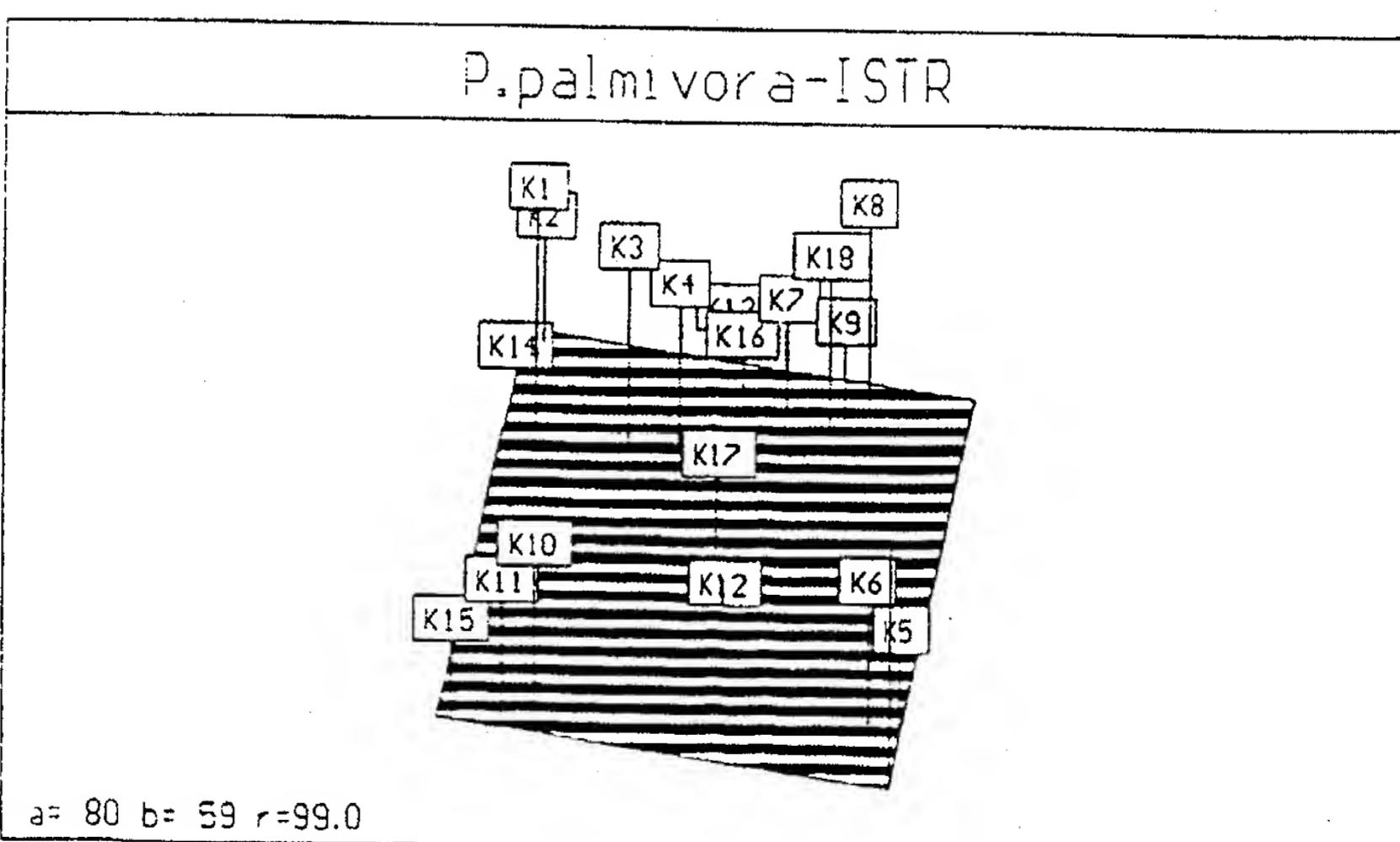
10/14

FIG. 10

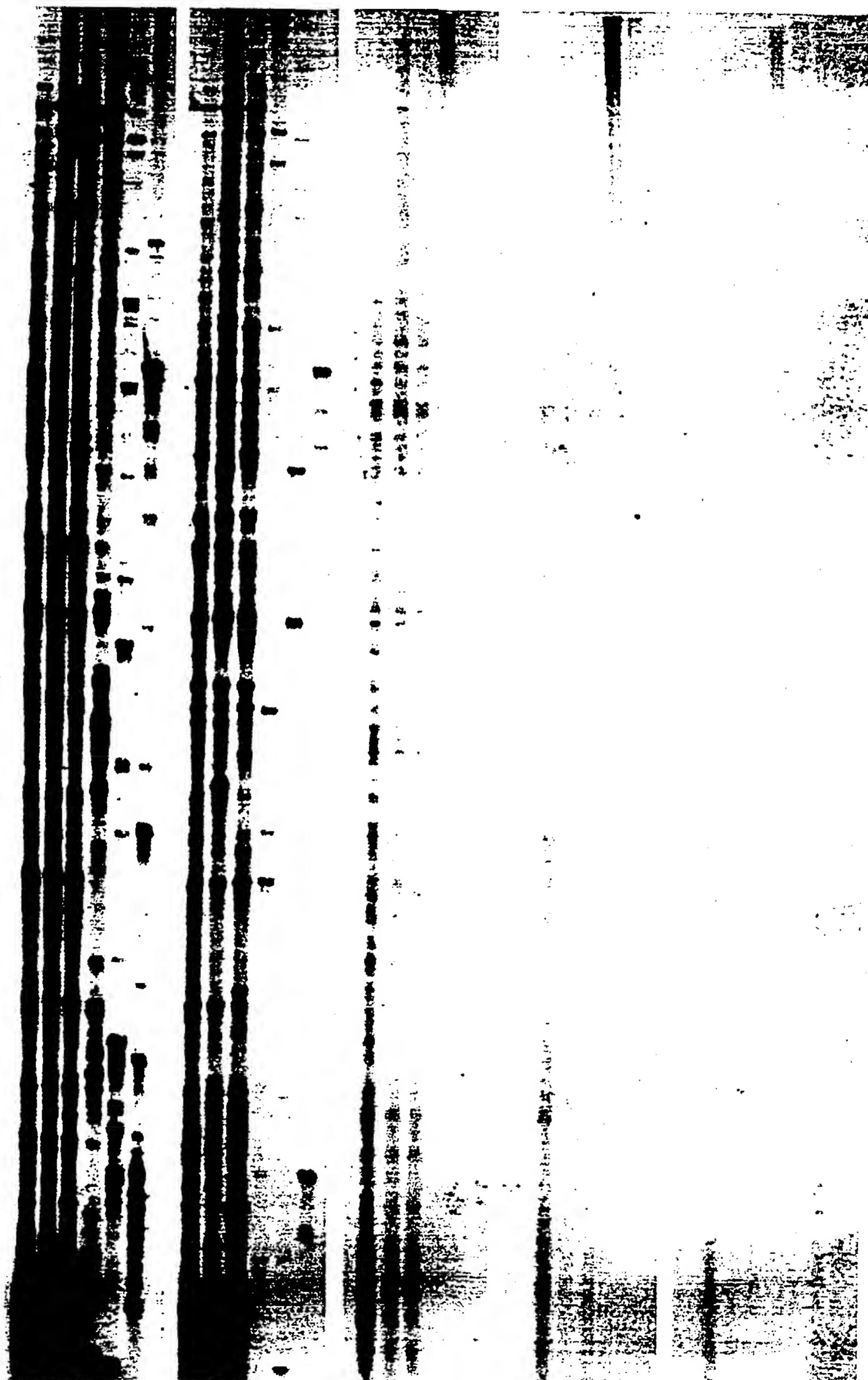


11/14

FIG. 10

B**C**

50 A 55 12/14 60 65 72



B 13/14
50 55 60 65 72



14/14

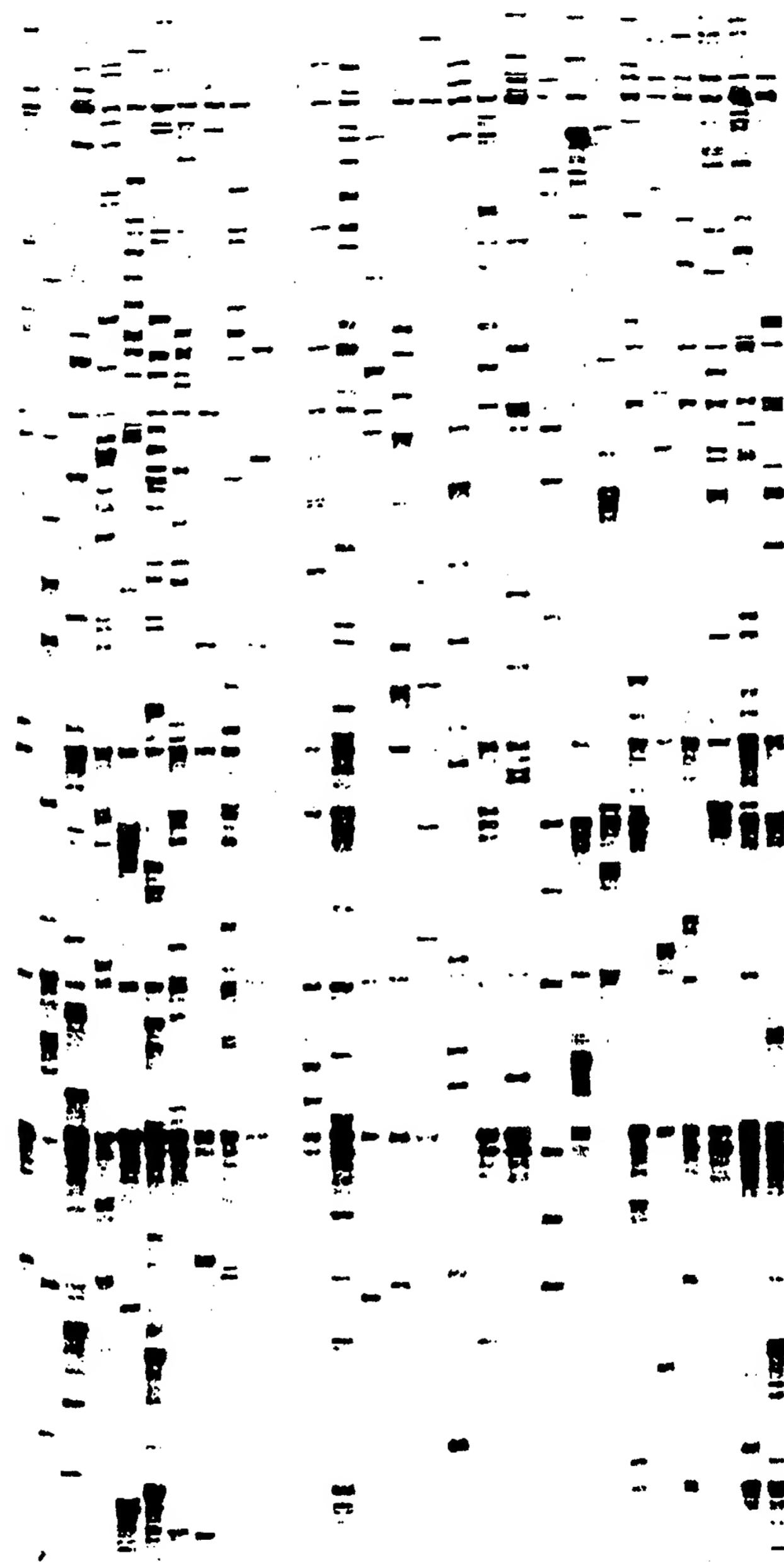


Fig. 14

**BERICHTIGTE
FASSUNG***

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/07885 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Februar 1999 (18.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04877			(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. August 1998 (05.08.98)			
(30) Prioritätsdaten: 97113601.5 6. August 1997 (06.08.97) EP			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE).			
(72) Erfinder; und			Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ROHDE, Wolfgang [DE/DE]; Untergasse 29, D-35418 Busek (DE). BECKER, Dieter [DE/DE]; Stuppstrasse 14, D-50823 Köln (DE). SALAMINI, Francesco [IT/DE]; Carl-von-Linné-Weg 1, D-50829 Köln (DE).			Mit internationalem Recherchenbericht.
(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).			(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 29. April 1999 (29.04.99)

(54) Title: THE USE OF PRIMERS FOR UNIVERSAL FINGERPRINT ANALYSIS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON PRIMERN FÜR UNIVERSELLE FINGERPRINT-ANALYSEN

(57) Abstract

The invention relates to the use of primers and primer pairs for DNA fingerprint analysis. According to the invention, finger prints can be obtained from people, animals, plants and micro-organisms with the primers and primer pairs. The invention also relates to the primers or primer pairs used for this purpose, and to kits containing the primers or primer pairs.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Primern oder Primerpaaren zur DNA-Fingerprint-Analyse, wobei mit den Primern oder Primerpaaren Fingerprints sowohl vom Menschen, als auch von Tieren, als auch von Pflanzen und von Mikroorganismen erhältlich sind. Die Erfindung betrifft ferner Primer oder Primerpaare zur vorstehend genannten Verwendung sowie Kits, die die Primer bzw. Primerpaare enthalten.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verwendung von Primern für universelle Fingerprint-Analysen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Primern oder Primerpaaren zur DNA-Fingerprint-Analyse, wobei mit den Primern oder Primerpaaren Fingerprints sowohl vom Menschen, als auch von Tieren, als auch von Pflanzen als auch von Mikroorganismen erhältlich sind. Die Erfindung betrifft ferner Primer oder Primerpaare zur vorstehend genannten Verwendung sowie Kits, die die Primer bzw. Primerpaare enthalten.

Nachfolgend werden Dokumente aus dem Stand der Technik zitiert, deren Offenbarungsgehalt hiermit durch Bezugnahme in dieser Anmeldung enthalten ist.

Es ist allgemein bekannt, daß die Anwesenheit polymorpher und heterogen verteilter repetitiver Sequenzen wie Mikrosatelliten für genetische Analysen Verwendung findet.

Es ist auch allgemein bekannt, daß Retrotransposons wie die copia-Elemente aus *Drosophila* und copia-ähnliche Elemente in anderen Spezies des Tier- und Pflanzenreichs in der Regel als Mehrfach-Kopien in Genomen enthalten sind. Repetitive Genomsequenzen dieser Art sind am Beispiel copia-ähnlicher Elemente in *Pisum* (Erbse) zur genetischen Analyse dieser Pflanzenspezies benutzt worden (Lee u.a., Plant Mol. Biol. 15: 707-722, 1990). Diese von den Autoren als OFLP bezeichnete Methode basiert auf einem copia-spezifischen Primer und als zweitem Primer für die PCR-Amplifikation einer Sequenz aus dem diese Retrotransposons flankierenden Erbsengenom. Damit ist es möglich geworden, Erbsensorten durch PCR-Amplifikation bestimmter Elemente der Erbsen-copia-Familie zu amplifizieren und durch Auftrennung der nicht-radioaktiv markierten PCR-Produkte im Agarosegel auf Polymorphismen zu testen und genetische

Verwandtschaften zu bestimmen. Auch andere Retrotransposons, z.B. Tos1-1, Tos2-1 und Tos3-1 aus Reis haben als molekulare genetische Marker zur Differenzierung und Identifizierung von Reis-Kultivaren durch RFLP-Analyse Verwendung gefunden (Fukuchi u.a., Jap. J. Genetics, 68: 195-204, 1993), wobei aber auch hier postuliert wurde, daß für andere Pflanzenspezies deren endogene Retrotransposons als molekulare Marker isoliert werden. Eine andere Arbeit (Purugganan und Wessler, Mol. Ecology 4: 265-269, 1995) benutzt eine auf PCR basierende Methode, welche die Variation in Spaltstellen für Restriktionsenzyme auf transponierbaren Elementen für eine Fingerprint-Analyse ausnutzt. Allen diesen im Stand der Technik beschriebenen Verfahren ist jedoch gemeinsam, daß die dort beschriebenen genetischen Marker bzw. Primer nicht universell bei Menschen, Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen einsetzbar sind. Es liegt auf der Hand, daß die Bereitstellung derartiger genetischer Marker oder Primer in vielen Bereichen der modernen Biologie oder Medizin wesentliche Vorteile mit sich bringen würde. Ein entscheidender Schritt in diese Richtung wurde mit der bislang nicht veröffentlichten internationalen Patentanmeldung PCT/EP97/00442 getan. Dort wird die Verwendung von Primern zur Fingerprint-Analyse beschrieben, wobei die Primer an das copia-ähnliche Element aus der Kokusnuß hybridisieren. Erstmals konnten mit dieser Anmeldung Primer bzw. Primerpaare bereitgestellt werden, die sich zur Fingerprint-Analyse sowohl im Menschen, als auch in Tieren, wie auch in Pflanzen und Mikroorganismen eignen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war, die vorstehend beschriebenen Nachteile aus dem publizierten Stand der Technik zu überwinden und Wege und Mittel bereitzustellen, die eine möglichst universelle Anwendbarkeit von Primern bzw. genetischen Markern bei der Fingerprintanalyse von Arten sowohl aus dem Tier- als auch aus dem Pflanzenreich wie auch beim Menschen und bei Mikroorganismen gestatten. Hinsichtlich der PCT/EP97/00472 sollten weitere Bereiche innerhalb der copia-ähnlichen Elemente identifiziert werden, die eine besonders vorteilhafte Ableitung der Primer gestatten bzw. sollten weitere vorteilhafte Primer identifiziert werden.

Die Lösung dieser Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

Vom publizierten Stand der Technik aus gesehen wurde nämlich überraschenderweise gefunden, daß Primer, die mit dem nachstehend näher

gekennzeichneten Bereichen aus dem copia-ähnlichen Element aus der Kokosnuß (*Cocos nucifera L.*) hybridisieren, und dort eine Fingerprint-Analyse ermöglichen, auch bei vielen anderen Spezies aus dem Tier- und Pflanzenreich einschließlich der Hefe wie auch beim Menschen und sogar Mikroorganismen mit Erfolg eingesetzt werden können. Dieser Befund erlaubt die universelle Anwendbarkeit der genannten Primer zur Fingerprint-Analyse im gesamten Tier- und Pflanzenreich sowie beim Menschen und bei Mikroorganismen.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung eines Primers oder Primerpaars zur DNA-Fingerprint-Analyse, das dadurch gekennzeichnet ist, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint sowohl von Menschen, als auch von Tieren, als auch von Pflanzen als auch von Mikroorganismen erhältlich ist, und wobei der Primer oder das Primerpaar an DNA, die die Endonuclease, die Reverse Transcriptase oder die RNase H eines copia- oder copia-ähnlichen Elements insbesondere aus der Kokosnuß (*Cocos nucifera L.*) codiert, hybridisiert.

Erfindungsgemäß hybridisiert der Primer/das Primerpaar mit Organismen aus mindestens einer Spezies der vorstehend genannten taxonomischen Gruppen. Dabei werden die in dieser Erfindung beschriebenen überraschenden Ergebnisse sowohl mit beliebigen Kombinationen unterschiedlicher Primer gegenläufiger Orientierung erreicht, die nur die Bedingung erfüllen müssen, daß sie an die vorstehend genannten DNAs hybridisieren, als auch unter Einsatz eines einzigen Primers, der aufgrund der Repetition des copia- oder copia-ähnlichen Elements, allerdings in 5'→3'/3'→5' Orientierung zweier benachbarter Elemente und nicht wie in Figur 2B dargestellt, in 5'→3'/5'→3'-Orientierung, ebenfalls die hochpolymorphen Fingerprints bereitstellt. Die vorstehend gewählte Begriffsbestimmung für die Primer schließt selbstverständlich ein, daß diese auch an DNAs anderer Organismen hybridisieren, sofern diese DNA-Sequenzen enthalten, die DNA-Sequenzen aus dem vorstehend genannten copia- oder copia-ähnlichen Element entsprechen.

Die Bedingungen, unter denen eine Hybridisierung der Primer und nachfolgende Amplifikation erfolgt, ist für den Fachmann ohne erfinderisches Bemühen aus dem Stand der Technik und dem nachfolgenden Beispielen ableitbar. Geeignete Bedingungen für die Hybridisierung der Primer und/oder der nachfolgenden Amplifikation können beispielsweise dem Lehrbuch Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989 (hiermit durch Bezugnahme enthalten) entnommen werden oder auch den nachfolgenden Beispielen.

Der Begriff "an DNA, die die Endonuclease, die Reverse Transcriptase oder die RNase H eines copia- oder copia-ähnlichen Elements insbesondere aus der Kokosnuß (*Cocos nucifera L.*) codiert, hybridisiert", bedeutet im Sinne dieser Erfindung, nicht nur, daß der Primer vollständig und in seiner gesamten Länge an diese DNA hybridisiert. Er bedeutet vielmehr auch, daß er an eine DNA hybridisiert, die mit der vorstehend definierten codierenden DNA überlappt. Dabei umfaßt der Überlappungsbereich mindestens 1 Nukleotid, vorzugsweise mindestens 5 Nukleotide und besonders bevorzugt mindestens 10 Nukleotide.

Die Länge der in dieser Erfindung verwendeten Primer beträgt vorzugsweise 15 bis 30 Nucleotide. Allerdings ist die Erfindung auch mit kürzeren oder mit längeren Primern durchführbar.

Der vorliegende Befund ist umso überraschender, als in der Regel im Stand der Technik davon ausgegangen worden ist, daß Primer lediglich in taxonomisch eng gesteckten Grenzen eingesetzt werden können, wenn aussagekräftige Fingerprints erhalten werden sollen.

Im Stand der Technik wurde von Rohde u.a. (J. Genet. & Breed., 46: 391-394, 1992) beschrieben, daß im Genom der Kokosnuß (*Cocos nucifera L.*) hochrepetitive Sequenzen mit Homologie zu auch in anderen Spezies beschriebenen copia-Elementen vorhanden sind, die nach Restriktion isolierter genomischer DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI und Auf trennung im Agarosegel als zwei, jeweils 1.3 und 1.4 Kilobasen große DNA-Banden sichtbar sind. Drei dieser "Ecorep" genannten DNA-Fragmente wurden nach Subklonierung sequenziert, und es konnten Sequenzunterschiede festgestellt werden. Versuche, diese Unterschiede für die genetische Analyse verschiedener Kokosnuß-Typen durch die Verwendung von Ecorep-Sequenzen als molekulare Sonde in RFLP-Analysen oder durch sequenzspezifische PCR-Primer auszunutzen, waren nicht erfolgreich (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 46: 391-394, 1992; Rohde, in: "La Recherche Europeene au Service du Cocosier - Actes du Seminaire - 8-10 septembre 1993, Montpellier". CIRAD (Collection: Colloques du CIRAD), Montpellier, S. 41-52).

Es wurde kürzlich für drei Kokosnuß-Typen gefunden, daß Subfamilien dieser 1.3 bzw. 1.4 Kilobasen großen Ecorep-Sequenzen existieren, in denen diese Elemente auf dem Kokosnuß-Genom nahe beieinander liegen d.h. in tandem wiederholt sind, und in denen in der Regel zumindest eine der beiden von den früher

identifizierten Elementen (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 46: 391-394, 1992) zu erwartenden EcoRI-Spaltstellen an den Enden der zunächst als "Spacer-Region" bezeichneten Sequenz fehlt (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995). Diese Spacer-Region zeigt hohe Homologie zu dem copia-ähnlichen BARE-1-Element aus Gerste (Fig. 1A; Manninen und Schulman, Plant. Mol. Biol., 22: 829-846, 1993). Bei dieser Subfamilie copia-ähnlicher Sequenzen im Kokosnuß-Genom handelt es sich daher um in tandem wiederholte Sequenzen, die Homologie zur Endonuclease- und Reversen Transkriptase/RNaseH-Region eines copia- bzw. copia-ähnlichen Elements aufweisen (siehe Fig. 1B). Die beobachteten Sequenzunterschiede in den Elementen dieser Subfamilie ließen sich jetzt - im Gegensatz zu den oben beschriebenen Versuchen für die EcoRep-Sequenzen - mit dem vorstehend beschriebenen, geeigneten PCR-Primern für die genetische Analyse in Kokosnuß ausnutzen. Dieses Verfahren zur Genomanalyse in Kokosnuß wurde als ISTR(inverse sequence-tagged repeat)-Analyse bezeichnet.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß diese Subfamilie mit hoher Sequenzkonservierung offensichtlich ubiquitär in der Pflanzen- und Tierwelt sowie beim Menschen und in Mikroorganismen vertreten ist, da die Verwendung der identischen ISTR-Primer (siehe auch Tabellen 1 und 2), wie sie auf der Basis der erfindungsgemäß ermittelten Kokosnußsequenzen entwickelt wurden, sowohl für andere Pflanzenspezies als auch für Tiere und den Menschen sowie den Mikroorganismen hochpolymorphe DNA-Fingerprints ergibt. Dabei lassen sich nicht nur eine Vielzahl von polymorphen Markern entdecken, die in der Nachkommenschaft segregieren ("single locus/multiple allele"-Marker), sondern es entstehen auch neue polymorphe Marker (Individuum-spezifische Marker), die z.B. in kontrollierten Kreuzungen (Beispiele Rind, Schaf) weder im Vater noch in der Mutter vorhanden sind und möglicherweise auf Rekombinationsereignisse oder die Amplifikation bestimmter genomischer Bereiche zurückzuführen sind. Jeder Fingerprint ist folglich einzigartig für den individuellen Nachkommen bei identischen Eltern. Im Humanbereich konnte gezeigt werden, daß dies sogar für einelige Zwillinge gilt, die für mehrere der verwendeten ISTR-Primer-Paare voneinander verschiedene Fingerprints zeigten (siehe Fig. 8).

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßigen Verwendung ist somit dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint mit DNAs aus dem gesamten Mikroorganismen-, Tier- und Pflanzenreich, umfassend

- (a) das Tierreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die Metazoen, darin enthalten die Unterstämme der Vertebraten, dabei vorzugsweise die Klasse der Säugetiere, darin enthalten insbesondere die Familie der Hominiden und die Familie der Bovidae, darin enthalten die Spezies *Bovis taurus* und *Ovis aries*, sowie alle Rassen und Varietäten, die sich aus den entsprechenden Spezies ableiten lassen;
- (b) das Pflanzenreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die der Mycobionta und Cormobionta, bei letzterer vorzugsweise die Abteilung der Spermatophyten, darin vorzugsweise die Klasse der Monocotyledonae mit ihren Familien der Areaceae und ihren Vertretern der Spezies *Cocos nucifera* oder der Familie der Poaceae mit ihren Vertretern der Spezies *Hordeum vulgare* und *Zea mays*, außerdem besonders bevorzugt die Klasse der Dicotyledonae mit ihren Familien, z.B. der Solanaceae und ihrem Vertreter der Spezies *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida*, oder z.B. die Familie der Brassicaceae mit ihrem Vertreter der Spezies *Brassica napus* oder die Familie der Chenopodiaceae mit ihrem Vertreter *Beta vulgaris* sowie alle Varietäten und Sorten, die sich von der entsprechenden Spezies ableiten lassen;
- (c) den Menschen; und
- (d) Mikroorganismen umfassend prokaryotische Mikroorganismen, dabei vorzugsweise Gram-positive Bakterien wie z.B. Milchsäurebakterien, Sarcina und Coryneforme Bakterien und Gram-negative Bakterien wie z.B. Neisseria und Enterobakterien, und eukaryotische Mikroorganismen umfassend Pilze, dabei vorzugsweise Phycomyceten wie z.B. *Phytophthora* und Ascomyceten wie z.B. Hefen

erhältlich ist.

Besonders vorteilhaft im Sinne der erfindungsgemäßen Verwendung ist, daß Fingerprints vergleichbarer Auflösung und Sensitivität mit DIG-markierten PCR-Produkten direkt im Gel ohne die generell in bekannter Weise vorgenommene Übertragung der DNA-Fragmente auf Membranen (Southern Blot) sichtbar gemacht wurden. Damit ist die Erstellung derartiger Fingerprints in einfacher Weise (Auftrennung der PCR-Fragmente im Sequenzgel, direkter Nachweis im Gel, Computer-unterstützte Datenanalyse durch direktes Einscannen der Sequenzgele) ohne die Verwendung von Radioaktivität ermöglicht worden.

Somit ist eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung dadurch gekennzeichnet, daß die zu analysierenden DNAs mit dem Primer oder dem Primerpaar durch PCR amplifiziert und nachfolgend der Größe nach auf einem Gel aufgetrennt werden.

Der Fachmann weiß aus dem Stand der Technik, wie er die Bedingungen für eine geeignete PCR auszuwählen hat. Auch Verfahren zur Auftrennung von PCR-amplifizierten DNAs auf einem Elektrophorese-Gel, das vorzugsweise ein Polyacrylamidgel ist, ist dem Stand der Technik zu entnehmen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Gel ein Sequenzgel. Die Herstellung von Sequenzgelen ist ebenfalls im Stand der Technik bekannt und beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet, daß als weiterer Schritt ein Southern Blot durchgeführt wird, und die auf die Membran übertragenen DNAs durch Hybridisierung mit einer Sonde sichtbar gemacht werden.

Diese Ausführungsform ist als Alternative zu den vorstehend beschriebenen beiden Ausführungsformen zu sehen. Sie erfordert zwar mehr Aufwand und den Umgang mit Radioaktivität, ist jedoch durchaus für Labors geeignet, die eine weniger aufwendige Laboreinrichtung betreiben, so z.B. keinen Scanner mit daran angeschlossenen Computer besitzen. Die Durchführung von Southern Blots sowie die Hybridisierungen mit einer geeigneten Sonde sind ebenfalls im Stand der Technik bekannt und beispielsweise in Sambrook et al., a.a.O., beschrieben.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist die Sonde der erfindungsgemäße Primer bzw. das erfindungsgemäße Primerpaar.

Da die Primer Bestandteil der amplifizierten DNA sind, ist durch sie in einfacher Weise auch ein Nachweis der Banden auf der für den Southern Blot verwendeten Membran möglich.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung trägt der Primer oder das Primerpaar eine Markierung.

In einer besonders bevorzugten Verwendung ist die Markierung eine nicht-radioaktive Markierung, insbesondere Digoxigenin, Biotin oder ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Farbstoff oder eine radioaktive Markierung, insbesondere ^{32}P .

Insbesondere die Markierung der Primer mit Digoxigenin und die Anfärbung nach Amplifikation der DNA und gelelektrophoretischer Auftrennung direkt im Gel kann von allen Labors oder interessierten Züchtern unter Einsatz eines geringen Geräteaufwands (PCR-Reaktion, Elektrophorese auf Sequenzgelen) und Verzicht auf Radioaktivität verwendet werden. Die Speicherung und Verarbeitung der Daten geschieht vorzugsweise durch direktes Einlesen des gefärbten und getrockneten Gels mittels Scanner in einen Computer. Weiterhin ist die Möglichkeit gegeben, durch Reisolierung von PCR-Produkten aus dem Sequenz-Gel, Reamplifikation und Sequenzierung spezifische Primer zu entwickeln, die allel-spezifische Amplifizierungsprodukte ergeben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der Primer eine der in Tabelle 2 angegebenen Sequenzen auf.

Diese Primer sind bevorzugte Beispiele der von den Erfindern in bisherigen DNA-Fingerprint-Analysen angewendeten Primer.

Ferner ist in der erfindungsgemäßen Verwendung besonders bevorzugt, daß der Primer eine Sequenz aufweist, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt. Dabei umfaßt der Überlappungsbereich mindestens 1 Nukleotid, vorzugsweise mindestens 5 Nukleotide und besonders bevorzugt mindestens 10 Nukleotide.

Die Sequenz dieser in der erfindungsgemäßen Verwendung einsetzbaren Primer kann nach Standardverfahren ermittelt werden, beispielsweise durch Sequenzierung der Sequenzen, die den in den Tabellen 1 und 2 dargestellten Oligonukleotidsequenzen in den copia- oder copia-ähnlichen Elementen benachbart sind.

Der Begriff "überlappende Sequenzen" umfaßt erfindungsgemäß auch Sequenzen, von denen die eine von einer anderen vollständig umfaßt ist. Zur Erläuterung sei dabei auf Tabelle 2 sowie Beispiel 9 verwiesen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet, daß die Fingerprint-Analyse für Biodiversitätsstudien, Studien zur genetischen Verwandtschaft, taxonomische Studien, und insbesondere in der Rechtsmedizin, der Züchtung, im Sortenschutz, im Genbank-

Management, in der Populationsgenetik und für Evolutionsstudien eingesetzt wird.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung Primer zur erfindungsgemäßen Verwendung, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Primer eine der in Tabelle 2 dargestellten Sequenzen aufweisen oder eine Sequenz, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt.

Ferner betrifft die Erfindung Kits, die mindestens 1 Primer und vorzugsweise mindestens 1 Primerpaar enthalten, der bzw. das an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisiert bzw. die vorstehend beschrieben wurden. Die Primer weisen vorzugsweise die in den Tabellen 1 und/oder 2 dargestellten Sequenzen oder damit überlappende Sequenzen auf. Die vorstehend Primer können in dem erfindungsgemäßen Kit in Behältern verpackt sein, beispielsweise in Gefäßen, gegebenenfalls in Puffern und/oder Lösungen. Falls angebracht können ein oder mehrere der Primer in ein und demselben Behälter verpackt werden. Die erfindungsgemäßen Kits können vielseitig eingesetzt werden. Beispielhafte Anwendungsbereiche wie die Züchtung wurden vorstehend angegeben.

Auch betrifft die Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Primer zur Herstellung der erfindungsgemäßen Kits. Die Herstellung der Kits selbst erfolgt vorzugsweise nach Standardverfahren.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung von Primern, die an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisieren, wobei die Primer vorzugsweise zu einer der vorstehend näher definierten Gruppen gehören, zu Nachweis von Rekombinationsereignissen bei Kreuzungen, insbesondere in der Tier- und Pflanzenzucht.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1: Bereich eines im Gerstengenom vorkommenden copia-ähnlichen Elements Bare-1 (Fig. 1A, aus Manninen und Schulman, Plant. Mol. Biol., 22: 829-846, 1993), der als in tandem wiederholte copia-ähnliche Sequenz (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995) im Genom der Kokosnuß (*Cocos nucifera* L.) gefunden wurde (Fig. 1B).



(A) Schematische Darstellung des copia-ähnlichen BARE-1-Elements aus Gerste.

ED: Endonuklease; RT: Reverse Transkriptase; RH: RNase H).

(B) Lage von repetitiven copia-ähnlichen Sequenzen aus der Kokosnuß relativ zu homologen Sequenzen auf dem Gersten-BARE-1-Element. Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Position der kürzlich gefundenen "Spacer-Region" (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995).

Fig. 2: Amplifikation der "Spacer-Region" zwischen benachbarten copia-ähnlichen Sequenzen im Kokosnuß-Genom (A) und ungefähre Position bisher verwendeter Primer für die ISTR-Analyse (B).

(A) Für die Amplifikation zur Klonierung und Sequenzierung der Regionen zwischen zwei benachbarten copia-ähnlichen Elementen der Kokosnuß wurden die Primerpaare ISTR5/ISTR-1 und ISTR5/ISTR-2 verwendet. Die Richtung der Pfeile symbolisiert die 5'→3'-Orientierung der verwendeten Oligodeoxynukleotide.

(B) Die einzelnen Primer sind in der Regel zwischen 18 und 20 Nukleotiden lang und wurden analog zur Sequenz des EcoRep1-Elements synthetisiert (Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995). Die mit "-" versehenen Primer sind komplementär zur kodierenden Sequenz des copia-Elementes und können mit jedem beliebigen Primer der "plus"-Serie für die ISTR-Analyse kombiniert werden.

Fig. 3: ISTR-Analyse von Populationen am Beispiel der Kokosnuß (aus Rohde u.a., J. Genet. & Breed., 49: 179-186, 1995).

(A) In den Spuren 1 bis 7 wurden einzelne Palmen einer East African Tall (EAT) Population durch ISTR-Analyse mit den Primerpaaren ISTR5/ISTR-2 (links) bzw. ISTR5/ISTR-1 (rechts) charakterisiert. In den Spuren 8 und 9 sind Kontrollanalysen einer einzelnen Rennell Island Tall(RLT)- oder Pemba Red Dwarf(PRD)-Palme aufgetragen.

(B) ISTR-Analyse zweier Malayan Yellow Dwarf(MYD)-Populationen aus Tanzania und den Philippinen mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2.

Fig. 4: Generelle Anwendung von ISTR-Primern im Pflanzenbereich.

DNA verschiedener Pflanzenspezies wurde einer Amplifikation mit den Primern ISTR5/ISTR-2 unterzogen. In den einzelnen Spuren wurden die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen:

1: Tabak, 2: Gerste, 3: Kartoffel, 4: Mais, 5: *Antirrhinum*, 6: *Arabidopsis*, 7: Raps, 8: *Craterostigma*, 9: Petunie, 10: Petersilie, 11: Sisal, 12: Milala-Palme, 13: *Borassus*-Palme, 14: Kokospalme, 15: Zuckerrübe, 16: *Cuphea*, 17: Hefe.

Fig. 5: ISTR-Analyse von einzelnen Angehörigen der Familie der Arecaceae (Palmae). DNAs von 17 verschiedenen Palmenarten wurden in einer Standard-PCR-Reaktion mit den Primern ISTR5/ISTR-2 amplifiziert und auf einem 4% PAGE-Gel aufgetrennt. In den einzelnen Spuren sind die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen: 1: *Hyphaene petersiana* Mart.; 2: *Bismarckia nobilis* Hildebrandt & H. Wendl.; 3: *Eugeissona utilis* Becc.; 4: *Korthalsia echinometra* Becc.; 5: *Mauritiella aculeata* (H.B. & K.) Burret; 6: *Nypa fruticans* Wurmb.; 7: *Pseudophoenix sargentii* H. Wendl. ex Sarg.; 8: *Oraniopsis appendiculata* (F.M.Bailey) J.Dransf., Irvine and N.W.Uhl; 9: *Socratea exorrhiza* (Mart.) H.Wendl.; 10: *Halmoorea tripatha* J. Dransf. & N.W.Uhl.; 11: *Cyrtostachys peekelianae* Becc.; 12: *Deckenia nobilis* H.Wendl.; 13: *Oncosperma tigillarium* (Jack) Ridley; 14: *Syagrus amara* (Jacq.f.) Mart.; 15: *Attalea allenii* H.E.Moore ex L.H.Bailey; 16: *Scheelea insignis* (Mart.) Karsten; 17: *Asterogyne martiana* (H.Wendl.) H.Wendl. ex Hemsley.

Fig. 6: ISTR-Analyse von Gerstensorten.

DNA von 35 verschiedenen Gersten-Genotypen wurden in einer Standard-PCR-Reaktion mit den Primern ISTR5/ISTR-2 amplifiziert und auf einem 4% PAGE-Gel aufgetrennt. In den einzelnen Spuren sind die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen: 1: Fiction; 2: Kaskade; 3: Red; 4: Georgie; 5: Alexis; 6: Marinka; 7: Flash; 8: Portikos; 9: Aura; 10: Gimpel; 11: Prisma; 12: Gitane; 13: Gavotte; 14: Manila; 15: Pilastro; 16: Masto; 17: Torrent; 17: Torrent; 18: Thibault; 19: Onice; 20: Mette; 21: Robur; 22: Probidor; 23: Tania; 24: Mario Otter; 25: Nico; 26: Magie; 27: Vogelsanger Gold; 28: Tekto 2002; 29: Asse; 30: Calcaroides-C15 (ex Bonus); 31: calcaroides-b2 (ex Bonus); 32: calcaroides-b19 (ex Bonus); 33: Bonus; 34: Christina; 35: Nudinka.

Fig. 7: Analyse einer Rinderfamilie (A) und zweier Schafsfamilien (B, C).
(A) Fünf Nachkommen sowie die beiden Eltern einer Rinderfamilie wurden einer ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2 unterzogen. V: Vater; M: Mutter. Die einzelnen Nachkommen sind numeriert. Der Pfeil deutet auf einen Marker, der nicht in allen Nachkommen auftritt.
(B, C) Analyse zweier Schafsfamilien mit Nachkommen einer Kreuzung zwischen dem identischen Vater und Mutter M1 (B) sowie Mutter M2 (C). Pfeile zeigen segregierende ISTR-Marker an; Sterne deuten auf individuum-spezifische Marker, die weder in den Eltern noch in den Geschwistern vorhanden sind.
GSM: Marker (untere Bande des Triplets), der mit der männlichen Geschlechtsausprägung kosegregiert. V: Vater. Die einzelnen Nachkommen der verschiedenen Züchtungen sind numeriert.

Fig. 8: Analyse dreier Menschenfamilien I, II und III mit verschiedenen Primerpaaren.
(A) ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-1. (B) ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-2. V: Kindvater; M: Mutter; SSM: sexspezifischer Marker. Die Nachkommen sind numeriert. Die beiden Nachkommen der Familien I und II sind eineiige Zwillinge.

Fig. 9: Figur 9 zeigt die DNA Analyse von Weinsorten. Für die ISTR-Fingerprint-Analyse wurde DNA aus 19 verschiedenen Weingenotypen mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2 einer PCR-Reaktion unterzogen. In den einzelnen Spuren wurden die PCR-Produkte folgender Pflanzen aufgetragen:
1. Sangiovese piccolo precoce, 2. Sangiovese dell'Elba, 3. Sangiovese polveroso Bonechi, 4. Colorino americano, 5. Prugnolino medio, 6. Colorino del Valdarno, 7. Morellino, 8. Brunellone, 9. Sangiovese forte, 10. Sangiovese R10, 11. Saragiolo, 12. Colorino di Pisa, 13. Prugnolino dolce, 14. Morellino di Scansano, 15. Colorino di Lucca, 16. Giacchè, 17. Tinturiér, 18. Sangiovese polveroso, 19. Prugnolo gentile.

Fig. 10: Analyse von *Phytophthora palmivora*-Isolaten aus den Philippinen mit der Primer-Kombination ISTR5/ISTR-2

1: #P8704 (DRC089; Davao City, Mindanao); 2: #P8646 (DRC001; Davao Sur, Mindanao); 3: #P8652 (DRC007; Davao City, Mindanao); 4: #P8650 (DRC005; Davao City, Mindanao); 5: #P8698 (DRC082; Zamboanga, Mindanao); 6: #P8684 (DRC065; De Oro City, Mindanao); 7: #P8676 (DRC053; Davao City, Mindanao); 8: #P8653 (DRC008; Davao Norte, Mindanao); 9: #P8647 (DRC002; Davao Norte, Mindanao); 10: #P8649 (DRC004; Davao Norte, Mindanao); 11: #P8662; 12: #P8663 (DRC030; Davao Norte, Mindanao); 13: #P8667 (DRC036; South Cotabato, Mindanao); 14: #P8651 (DRC006; Davao Sur, Mindanao); 15: #P8674 (DRC047; Batangas, Luzon); 16: #P8660 (DRC025; Laguna, Luzon); 17: #P8705 (DRC090; Davao Norte, Mindanao); 18: #P8665 (DRC033; South Cotabato, Mindanao).
M: Kontroll-Reaktion mit DNA der MRD(Malayan Red Dwarf)-Kokospalme.

Fig. 11: ISTR-Analyse genomischer DNA mit den ISTR-Primerpaaren F6/B7 (Fig. 11A) und F21/B21 (Fig. 11B).

A. Die einzelnen Spuren sind DNA-Fingerprints folgender genomischer DNAs. 1: EAT (Kokusnuß); 2: PRD (Kokusnuß); 3: SRT (Kokusnuß); 4: Mensch; 5: Hamster; 6: Rostpilz.

B. Spur 1: EAT (Kokusnuß); 2: PRD (Kokusnuß); 3: SRT (Kokusnuß); 4: Mensch; 5: Raps; 6: Gerste.

Die angegebenen Zahlenwerte über den Spuren entsprechen den in der Standard-PCR-Reaktion gewählten "annealing"-Temperaturen.

Fig. 12. ISTR-Analyse von verschiedenen Isolaten des Rostpilzen *Puccinia recondita* f.sp. *secalis* mit der Primerkombination F6/B3 (siehe Tabelle 2).

DNAs von verschiedenen Rostpilzisolaten wurden in einer Standard PCR-Reaktion mit den Primern F6/B3 (siehe Tabelle 2) amplifiziert und auf einem 4%igen Page-Gel aufgetrennt.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Nachweis von Längenpolymorphismen bei der Kokosnuß

Für diesen Versuch, der in Fig. 3 dargestellt ist, wurden die Primerpaare ISTR5/ISTR-2 und ISTR5/ISTR-1 (siehe Tabelle 1) verwendet. Als zu untersuchende DNAs werden die genomischen DNAs von einzelnen Palmen aus Populationen von East African Tall (EAT) und Malayan Yellow Dwarf (MYD) sowie je einer einzelnen Palme Rennel Island Tall (RLT) und Pemba Red Dwarf (PRD) verwendet. Die betreffenden Oligodeoxynukleotide (Primer) wurden mit Hilfe der Polynukleotidkinase in bekannter Weise an ihrem Ende mit ^{32}P radioaktiv markiert und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Diese wird standardmäßig in einem Volumen von 20 μl durchgeführt und enthält je 1 pmol der Primer und 25 ng der zu amplifizierenden genomischen DNA in 1x PCR-Reaktionspuffer (z.B. der Firma GIBCO/BRL), 2.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP (Deoxynukleosid-Triphosphate), und 1 Einheit Taq-DNA-Polymerase. Das Gemisch wird zunächst für 3 Min. bei 95°C denaturiert und danach werden insgesamt 40 Zyklen von 95°C (30 Sekunden, Denaturierung), 45°C (30 Sekunden, Anlagerung) und 72°C (2 Minuten, Synthese) durchgeführt. Die Reaktion wird durch einen Syntheseschritt (72°C für 10 Minuten) beendet, 10 μl Farbstoffgemisch (in Formamid) hinzugefügt und nach erneutem Erhitzen 3 μl davon auf einem 4% Polyacrylamid-Sequenzgel aufgetrennt. Das Gel wird nach Trennen der beiden Glasplatten in bekannter Weise an einer der Sequenz-Glasplatten getrocknet und die aufgetrennten radioaktiv markierten PCR-Produkte durch Belichten eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Wie aus Fig. 3 hervorgeht, sind eine Reihe von DNA-Produkten allen Palmen gemein, aber es sind in beiden Populationen auch Unterschiede in einzelnen Palmen zu beobachten. Dies ist weniger überraschend für den "Tall"-Typ EAT (Fig. 3A), da für diese Kokosnuß-Typen Fremdbefruchtung im Feld beobachtet worden ist. Überraschenderweise entdeckt die ISTR-Analyse jedoch auch im allgemeinhin als autogam geltenden "Dwarf"-Palmentyp wie MYD Unterschiede innerhalb der Populationen sowie auch Unterschiede zwischen den Populationen aus Tanzania und den Philippinen (Fig. 3B). Mit bisher verwendeten RFLP-Markern konnten Unterschiede in Dwarf-Populationen nicht nachgewiesen wer-

den. Darüberhinaus ist ersichtlich, daß die Verwendung des Primerpaars ISTR5/ISTR-1 nicht nur - wie von der Lage des ISTR-1-Primers erwartet (Fig. 2B) - etwa 100 bp kleinere PCR-Produkte ergibt, sondern auch neue Polymorphismen verursacht. Die Ursache hierfür kann nur vermutet werden, aber dieser Befund eröffnet die Möglichkeit, basierend auf den ermittelten copia-ähnlichen Sequenzen der Kokosnuß alle denkbaren copia-ähnlichen Sequenzen und Primerkombinationen für die ISTR-Analyse einzusetzen. Dieses einfache Experiment zeigt daher eindrucksvoll, wie bereits mit Hilfe einer einzigen PCR-Amplifikation unter Verwendung des identischen Primerpaars eine reproduzierbare Fingerprintanalyse einzelner Palmen und Aussagen zur genetischen Homogenität von Populationen ermöglicht werden. Dieses experimentelle Protokoll ist für alle ISTR-Primer anwendbar und wurde, wenn nicht anders angegeben, auch für die nachfolgenden Beispiele benutzt.

Tabelle 1

Beispiele verwendeter Oligodesoxynukleotide (ISTR-Primer) für die ISTR-Analyse

ISTR-Primer Sequenz (5'→3')

Vorwärtsprimer

ISTR1 AGG AGG TGA ATA CCT TAG

ISTR2 AAA ATG GCA TAG TCT CTC

ISTR3 GTC GAC ATG CCA TCT TTC

ISTR4 TAT AGT ACC TAT TGG GTG

ISTR5 ATA TAT GGA CTT AAG CAA GC

ISTR6 GTA TTG TAC GTG GAT GAC ATC

ISTR7 CAA CAG TGC TCC CAC TGA

ISTR7' TGC TAG GAC TTT CAC AGA

Rückwärtsprimer

ISTR-1 TTT TCT ACT TCA TGT CTG A

ISTR-2 AAT AAA TCG ATC ATC GAC

ISTR-3 ATT CCC ATC TGC ACC AAT

ISTR-4 ATG TCA TCC ACG TAC AAT

ISTR-5 CTT CTG TGA AAG TCC TAG

Beispiel 2

Test auf generelle Anwendung bei Pflanzen

Um die Möglichkeit zu ergründen, die Kokosnuß-spezifischen ISTR-Primer generell in Pflanzen für den Nachweis von DNA-Polymorphismen in copia-ähnlichen Sequenzen anzuwenden, wurden in dem in Beispiel 2 durchgeföhrten Versuch die genomischen DNAs verschiedener Pflanzen mit dem ISTR-Primerpaar ISTR5/ISTR-2 in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Aus Fig. 4 ist ersichtlich, daß von Tabak- bis zu Hefe-DNA alle eingesetzten DNAs durch Kokosnuß-spezifische Primer individuelle PCR-Produkte ergeben. Ähnliche Versuche wurden auch mit anderen ISTR-Primerkombinationen durchgeföhr. Dies zeigt, daß ähnliche wie die für Kokosnuß beschriebenen Familien von benachbart gelegenen copia-ähnlichen repetitiven Elementen in niederen und höheren Pflanzen existieren und für eine Fingerprintanalyse zugänglich sind. Als Konsequenz ist die ISTR-Analyse daher über die in Beispiel 1 für eine einzelne Pflanzenspezies gezeigte Möglichkeit hinaus anwendbar für die Charakterisierung genetischer Diversität und das Erfassen pflanzengenetischer Resourcen, entweder in Genbanken oder durch in situ-Konservierung.

Beispiel 3

Test auf Anwendung innerhalb einer Pflanzenfamilie am Beispiel der Palmen (Arecaceae)

Die mögliche Anwendung der ISTR-Analyse zu taxonomischen Studien wurde mit Hilfe des ISTR-Primerpaars ISTR5/ISTR-2 an Pflanzenspezies der Familie Arecaceae (Palmae) durchgeführt. Dazu wurden DNAs von 17 Palmenarten (siehe Legende zu Fig. 5) in einer PCR-Reaktion mit den erwähnten Primern amplifiziert und die PCR-Produkte in bekannter Weise analysiert. Wie aus Fig. 5 ersichtlich, wird für jede Palme ein unterschiedlicher Fingerprint erhalten, der es ermöglicht, die Daten durch Computer-unterstützte Auswertung einer entsprechenden Matrix zur Ermittlung biologischer Diversität durch die Erstellung von Dendrogrammen nach üblichen Verfahren zu verarbeiten. Für die praktische Anwendung ist zum Beispiel von Bedeutung, welche genetische Verwandtschaft etwa zwischen den bedeutenden Ölpflanzen der Öl- und der Kokosnuss-Palme existieren. Genetische Marker etwa für das für die Ölausbeute bedeutsame Merkmal der Nußschalen-dicke könnten dann in beiden Spezies für die Züchtung Anwendung finden, wenn diese genetisch hochverwandt sind.

Beispiel 4

Test auf Anwendung bei gezüchteten Sorten am Beispiel der Gerste

Die Charakterisierung von gezüchteten Sorten durch Fingerprintanalyse mit Hilfe der ISTR-Technologie wurde am Beispiel von Gerstensorten getestet. Fig. 6 zeigt eine PAGE-Analyse von PCR-Produkten, die für insgesamt 35 Varietäten bzw. Genotypen erhalten wurde. Die hohe genetische Verwandtschaft der untersuchten Hochleistungssorten ist aus der hohen Anzahl von monomorphen DNA-Fragmenten ersichtlich. Dennoch konnten allein aus dieser einen Analyse insgesamt 44 polymorphe Marker identifiziert werden, die vor allem im oberen Bereich des Sequenzgels gelegen waren. Diese Marker wurden in einer Matrix angeordnet und daraus nach der UPGMA-Methode ein Dendrogramm ermittelt. Die Tatsache, daß die Sorte Bonus (Spur 33) nicht von calcaroides-b19 (Spur 32) zu unterscheiden ist, ist nicht weiter verwunderlich, da dieser Genotyp eine in Bonus erzeugte rezessive Mutante ist. Dies gilt allerdings auch für die Genotypen Calca-

roides-C15 (Spur 30) und calcaroides-b2 (Spur 31), die durch Mutagenese im selben genetischen Hintergrund erzeugt worden waren. Allerdings wurden hier für die Mutagenese Neutronen-(Calcaroides-C15) bzw. Röntgenstrahlen (calcaroides-b2) als Mutagene verwendet, die auf chromosomaler Ebene in der Regel zu Deletionen und Inversionen führen, während calcaroides-b19 aus Bonus durch Natriumazid-Behandlung erhalten wurde, die Punktmutationen hervorruft. Dieses Beispiel erläutert daher einmal, daß die ISTR-Analyse Hinweise auf Umordnungen des genetischen Materials zu geben vermag. Zweitens ist allein aus der Verwendung eines einzigen ISTR-Primerpaars eine Fingerprintanalyse von Hochleistungssorten möglich. Daraus folgt, daß mit der Verwendung weiterer ISTR-Primerpaare ein eindeutiger sortenspezifischer Fingerprint erhalten werden kann, der als biochemische Charakterisierung der Sorte dient (Sortenschutz).

Beispiel 5

Test auf Anwendung bei Tieren: Evidenz für segregierende sowie neu entstehende Marker in Familien

Zum Test auf die generelle Anwendbarkeit der ISTR-Analyse genetischen Materials außerhalb des Pflanzenreichs wurden Tierfamilien untersucht, bei denen der Vater durch kontrollierte Züchtung (in vitro-Fertilisation) bekannt war. Fig. 7 illustriert eine ISTR-Analyse mit dem Primerpaar ISTR5/ISTR-2 an einer Rinderfamilie (Fig. 7A) und an zwei Schaffamilien mit identischem Vater, aber zwei verschiedenen Müttern M1 (Fig. 7B) und M2 (Fig. 7C). Aus beiden Analysen ist ersichtlich, daß 1) Kokosnuss-spezifische ISTR-Primer auch im Tierreich zur Fingerprintanalyse angewendet werden können, und daß 2) sowohl segregierende Marker (siehe Pfeile in Fig. 7C) als auch Individuum-spezifische Marker (siehe Sterne in Fig. 7) durch die ISTR-Analyse zugänglich sind. Einen Hinweis, daß segregierende ISTR-Marker mit wichtigen Phänotypen cosegregieren können, gibt die mit SSM (sexspezifischer Marker) bezeichnete DNA-Bande des prominenten Triplets in Fig. 7B, C: Diese Bande ist im Vater, nicht jedoch in den beiden Müttern vorhanden. Tatsächlich sind die beiden Nachkommen der Familie 1 (Fig. 7B) weiblichen Geschlechts, während die Familie 2 (Fig. 7C) einen männlichen Nachkommen hat. Die Tatsache, daß elterliche Marker nicht in allen Nachkommen vorhanden sind (siehe Pfeil in Fig. 7A) bzw. daß neue Marker entstehen

(siehe Sterne in Fig. 7), kann als Hinweis interpretiert werden, daß die ISTR-Analyse Rekombinationsereignisse bei Kreuzungen entdecken kann.

Beispiel 6

Test auf Anwendung beim Menschen: Evidenz für geschlechts- und Individuum-spezifische Polymorphismen

Dieses Beispiel erläutert die Anwendung der ISTR-Analyse im humanen Bereich. Dazu wurden drei Familien I, II und III analysiert, wobei die beiden Kinder der Familien I und II jeweils homozygote (eineiige) Zwillinge waren. Da von vornherein nicht zu erwarten war, daß ISTR-Primer DNA-Polymorphismen bei eineiigen Zwillingen entdecken können (hochpolymorphe Mikrosatellitenprimer zeigen keine Unterschiede; Haas, Institut für Rechtsmedizin, Universität Giessen; persönliche Mitteilung), wurden 6 verschiedene ISTR-Primerpaare getestet. Bei allen 6 Analysen sind DNA-Polymorphismen sichtbar, und zwei der ISTR-Analysen mit den Primerpaaren ISTR6/ISTR-1 und ISTR6/ISTR-2 sind in Fig. 8 dargestellt. Die Analyse mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-1 (Fig. 8A) ist bemerkenswert für die Vielzahl von polymorphen DNA-Banden, die Individuum-spezifisch sind und selbst bei den beiden Paaren von eineiigen Zwillingen der Familien I und II eine eindeutige Charakterisierung des individuellen Menschen zulassen. Dies trifft ebenfalls für die in Fig. 8B mit dem Primerpaar ISTR6/ISTR-2 durchgeführte ISTR-Analyse zu, auch wenn die Anzahl der polymorphen Banden geringer ist. Bemerkenswerterweise findet sich hier unter den neuen Polymorphismen eine DNA-Bande (SSM in Fig. 8B), die nur in den drei Vätern, nicht jedoch in den drei Müttern und den fünf Kindern auftritt. Tatsächlich könnte es sich hier, wie im Beispiel 5 für die Schaffamilien erwähnt, um einen geschlechtsspezifischen Marker handeln, da alle 5 Kinder weiblichen Geschlechts sind und somit eine strikt geschlechtsspezifische Segregation bei insgesamt 11 Individuen gegeben ist.

Beispiel 7

Nachweis von ISTR-Fingerprints bei Wein

Für diesen Versuch, der in Figur 9 dargestellt ist, wurde das Primerpaar ISTR5/ISTR-2 (siehe Tabelle 1) verwendet. Als zu untersuchende DNAs wurden die genomischen DNAs von 19 *Vitis vinifera* L. Pflanzen einschließlich 13 vermuteter "Sangiovese" Genotypen und 6 "gefärbte" Ecotypen verwendet, deren Früchte von Bedeutung für die intensive Rotfärbung des Weines sind. Aus Figur 9 ist ersichtlich, daß eine große Anzahl polymorpher DNA-Fragmente erhalten wurde. Obwohl die Variabilität am größten in den "gefärbten" Ecotypen ist, konnte die ISTR-Analyse außerdem einen hohen Anteil von Polymorphismen in den "Sangiovese"-Genotypen feststellen. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf die polyclonale Herkunft vieler Weinkultivare zurückzuführen. Daher zeigt auch dieses Beispiel, daß die ISTR-Analyse eine effiziente und sensitive Methode für die Untersuchung der genetischen Diversität innerhalb von Ecotypen und für die Identifizierung von einzelnen Clonen einsetzbar ist.

Beispiel 8

Anwendung des ISTR-Fingerprints bei Mikroorganismen

Als Beispiel für die Anwendung der ISTR-Technologie auf Mikroorganismen dienten Isolate des Pilz *Phytophthora palmivora*, der auf Kokospalmen lethale Erkrankungen ("bud rot") hervorruft. Es wurde hier ein besonders diffiziles Beispiel für die Anwendung einer DNA-Marker-Technologie gewählt, für das eigentlich aufgrund der begrenzten genetischen Diversität nur wenige Polymorphismen erwartet wurden, da es sich in allen Fällen um *P. palmivora*-Isolate handelte, die zudem ausschließlich in den Philippinen isoliert wurden und auch hier überwiegend lokal begrenzt waren (die Isolate stammten vorwiegend von der Insel Mindanao).

Es wurden je 1 µg DNA von achtzehn *P. palmivora*-Isolaten aus den Philippinen in einer Standard-PCR-Reaktion mit der Primer-Kombination ISTR5/ISTR-2 amplifiziert, die Produkte in bekannter Weise durch PAGE auf einem 4%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die einzelnen Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Fig. 10 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Bereits durch die Gelanalyse (Fig. 10A) werden mit einer einzigen ISTR-Primer-Kombination eine Fülle polymorpher DNA-Fragmente sichtbar. Dreißig dieser Banden wurden nach bekannten Verfahren der Cluster-Analyse ausgewertet zu Phenogrammen nach

der UPGMA-Methode (SAHN-Clustering; Fig. 10B) und durch PCA (principal coordinate analysis; Fig. 10C). Die erhaltenen Daten stimmen gut mit der anhand von RAPD-DNA-Marker-Analysen vorgenommenen Klassifizierung dieser Isolate überein.

Beispiel 9

Spezifität der ISTR-Analyse bei überlappenden Primer-Paaren

Die nachstehend genannten und in Tabelle 2 aufgeführten Oligodesoxynukleotide (Primer) wurden mit Hilfe der Polynukleotidkinase in bekannter Weise an ihrem Ende mit ^{32}P radioaktiv markiert und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Diese wurde standardgemäß in einem Volumen von 20 μl durchgeführt und enthielt je 1 pmol der Primer und 25 ng der zu amplifizierenden genomischen DNA in 1x PCR-Reaktionspuffer (z.B. der Firma GIBCO/BRL), 2.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTPs (Desoxynukleosid-Triphosphate), und 1 Einheit Taq-DNA-Polymerase. Das Gemisch wurde zunächst für 3 Min. bei 95°C denaturiert. Danach wurden insgesamt 40 Zyklen von 95°C (30 Sekunden, Denaturierung), 50°C bzw. wie in der Legende zu Fig. 11 angegeben (30 Sekunden, Anlagerung oder "annealing") und 72°C (2 Minuten Synthese) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch einen Syntheseschritt (72°C für 10 Minuten) beendet, 10 μl übliches Farbstoffgemisch (in Formamid) hinzugefügt und nach erneutem Erhitzen 3 μl davon auf einem 4% Polyacrylamid-Sequenzgel aufgetrennt. Das Gel wurde nach Trennen der beiden Glasplatten in bekannter Weise an einer der Sequenz-Glasplatten getrocknet und die aufgetrennten radioaktiv markierten PCR-Produkte durch Belichten eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Dieses experimentelle Protokoll ist für alle ISTR-Primer anwendbar und wurde, wenn nicht anders angegeben, auch für die nachfolgenden Beispiele benutzt.

Tabelle 2

PCR-Primer für die ISTR-Analyse mit F(forward)- und B(backward)-Primern

Vorwärtsprimer

F1	AGG AGG TGA ATA CCT TAG
F2	TTT TCT ACT TCA TGT CTG AAT
F3	AAA ATG GCA TAG TCT CTC
F4	GTC GAC ATG CCA TCT TTC
F5	TAT AGT ACC TAT TGG GTG
F6	ATA TAT GGA CTT AAG CAA GC
F7	GTA TTG TAC GTG GAT GAC ATC C
F8	CAA CAG CGC TCC CAC TGA
F9	TGC TAG GAC TTT CAC AGA
F10	CAA CAG TGC TCC CAC TGA
F11	TAA TAG TGC TCC CAT TGA TCT
F12	TTG GAC AAC CAT ATT TTG ACT
F13	ATA TGG ACT TAA GCA AGC CA
F14	ACC CTT TTC TAC TTC ATG TCT
F15	GAT CAA AAA GTT TGG TTT CAT
F16	TAG AGT TTT CCA TAC TAA ACC
F17	GCT CGG TAC CCA TAT ATG G
F18	CAT ATT GGC GTT CAT GGA G
F19	TCC ATG AAA GAC CTA GGT GA
F20	AGT ATG GAA AAC TCT AAG AGG
F21	ATA TAT GGA CTT AAG CAA GCA TCT CGG AGC

Rückwärtsprimer

B1	TTT TCT ACT TCA TGT CTG AAT
B2	AAT AAA TCG ATC ATC GAC TC
B3	GGA TAT CCT ATG AAT CAA GC
B4	ATT CCC ATC TGC ACC AAT
B5	ATG TCA TCC ACG TAC AAT
B6	CTT CTG TGA AAG TCC TAG
B7	AAT CGT GTA TCT TCA AAA AAG
B8	ATA TAT GGA CTT AAG CAA GCA
B9	GGA ATA TCA TTC CCA ATA AG
B10	CCT CCT TAT TGG GAA TGA TAT
B11	GAA ACG AGT GTT CCA GTT C
B12	GAC CCT TTT GAA AAC ACA TG
B13	TCT TGG AGT TGG AAC ACT C

B14	GTT TCA ATG ATG TGA TCA AAA A
B15	GGG TAT TAA TCC CCT CCT AG
B16	AAA CCT AGC GGC TAT TCC AT
B17	GGC TAC AAT AGC ATG CAA TG
B18	CAG AGT TGA TAT CTG ATA TCG
B19	CCT CTA TAT CCT TTG AAA TAG
B20	CAC ATT GTG ATC TTC TAT AAT
B21	AAT AAA TCG ATC ATC GAC TCT AAA GGA CCT

Im angeführten Beispiel der Temperaturabhängigkeit der PCR-Amplifikation während der ISTR-Analyse wurden 2 Primerpaare verwendet, die i) überlappen (F6 mit F21 sowie B7 mit B21; siehe Tabelle 2) und ii) sich durch die Länge unterscheiden:

- i) Überlappende Primer
- A) ISTR-Primerpaar F6(20mer)/B7(21mer)
- B) ISTR-Primerpaar F21(30mer)/B21(30mer)

Die gesamte Sequenz der Primer F6 und B7 ist in den Primern F21 bzw. B21 enthalten. Die in Fig. 11A und B gezeigten Ergebnisse belegen, daß auch überlappende Primer für die ISTR-Analyse benutzt werden können und zu voneinander verschiedenen DNA-Fingerprints führen (jeweils Spuren 1-3).

ii) Temperaturabhängigkeit der ISTR-Analyse

Die Spezifität der ISTR-Primer gegenüber den sogenannten "arbitrary primers" (beliebig primende Oligodesoxynukleotide), wie sie von J. Welsh und M. McClelland in "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers", Nucleic Acids Res., 18:7213-7218 (1990) beschrieben worden sind, wurde durch die Temperaturabhängigkeit der PCR-Reaktion gezeigt. Während die von Welsh und McClelland beschriebenen Primer selbst bis zu einer Länge von 34 Nukleotiden keine PCR-Amplifikation bei 52 Grad "annealing"-Temperatur mehr ergaben (op. cit., s. 7215), zeigte die ISTR-Analyse mit den 30mer-ISTR-Primern sogar bei einer "annealing"-Temperatur von 72 Grad sowohl im homologen (Kokusnuß) als auch im heterologen System (Mensch, Raps, Gerste) diskrete und reproduzierbare Fingerprints (Fig. 11B). Wie auf der Basis der Lehre diese Anmeldung für die Länge der gewählten Primer im ISTR-Primerpaar F6(20mer)/B7(21mer) nicht anders zu erwarten, erhielt man bei einer "annealing"-

Temperatur von 55 Grad noch eine gute Amplifikation, nicht dagegen bei 60 Grad (Fig. 11A).

Beispiel 10

Nachweis von ISTR-Fingerprints bei verschiedenen Isolaten des Rostpilz *Puccinia recondita* f.sp. *secalis*

Als ein weiteres Beispiel der Anwendung der ISTR-Technologie auf Mikroorganismen dienten verschiedene Isolate des Rostpilz *Puccinia recondita* f.sp. *secalis*. In diesem Versuch, der in Figur 12 dargestellt ist, wurde DNA aus Einzelpustel-Isolaten des Rostpilzes isoliert und das Primerpaar F6/B3 (siehe Tabelle 2) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde wie in Beispiel 8 beschrieben durchgeführt, und die Produkte nach an sich bekannter Weise durch PAGE auf einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die einzelnen Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Wie Figur 12 zeigt, wird wiederum mit einer einzigen ISTR-Primerkombination eine Fülle polymorpher DNA-Fragmente erzeugt, durch die sich die verschiedenen Rostpilzisolate unterscheiden lassen. Daher ist dieses Experiment ein weiterer Beleg für die Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen ISTR-Technologie bei Mikroorganismen.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Primers oder Primerpaars zur DNA-Fingerprint-Analyse, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint sowohl von Menschen, als auch von Tieren, als auch von Pflanzen als auch von Mikroorganismen erhältlich ist, und wobei der Primer oder das Primerpaar an DNA, die die Endonuclease, die Reverse Transcriptase oder die RNase H eines copia- oder copia-ähnlichen Elements insbesondere aus der Kokosnuß (Cocos nucifera L.) codiert, hybridisiert.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Primer oder dem Primerpaar ein Fingerprint mit DNAs aus dem gesamten Tier- und Pflanzenreich, umfassend
 - (a) das Tierreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die Metazoen, darin enthalten die Unterstämme der Vertebraten, dabei vorzugsweise die Klasse der Säugetiere, darin enthalten insbesondere die Familie der Hominiden und die Familie der Bovidae, darin enthalten die Spezies Bovis taurus und Ovis aries, sowie alle Rassen und Varietäten, die sich aus der entsprechenden Spezies ableiten lassen;
 - (b) das Pflanzenreich mit allen Unterreichen, vorzugsweise die der Mycobionta und Cormobionta, bei letzterer vorzugsweise die Abteilung der Spermatophyten, darin vorzugsweise die Klasse der Monocotyledonae mit ihren Familien der Areaceae und ihren Vertretern der Spezies Cocos nucifera oder der Familie der Poaceae mit ihren Vertretern der Spezies Hordeum vulgare und Zea mays, außerdem besonders bevorzugt die Klasse der Dicotyledonae mit ihren Familien, z.B. der Solaneceae und ihrem Vertreter der Spezies Solanum tuberosum, Nicotiana tabacum, Petunia hybrida, oder z.B. die Familie der Brassicaceae mit ihrem Vertreter der Spezies Brassica napus oder die Familie der Chenopodiaceae mit ihrem Vertreter Beta vulgaris sowie alle Varietäten und Sorten, die sich von der entsprechenden Spezies ableiten lassen;
 - (c) den Menschen; und

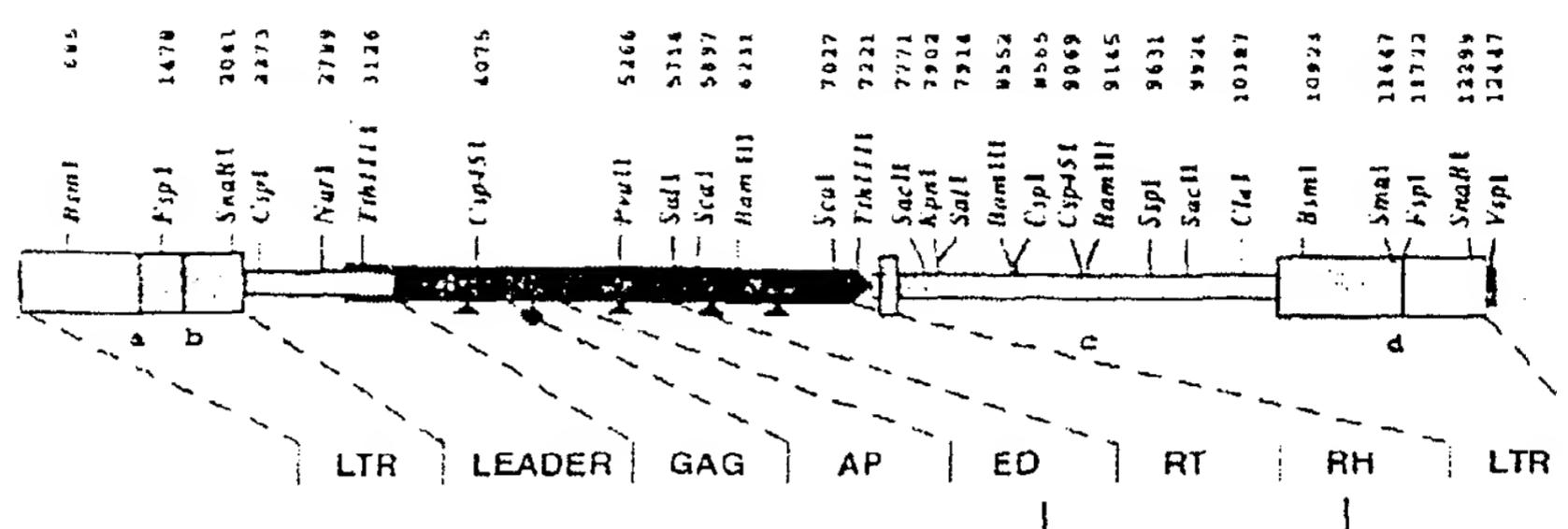
(d) Mikroorganismen umfassend prokaryotische Mikroorganismen, dabei vorzugsweise Gram-positive Bakterien wie z.B. Milchsäurebakterien, Sarcina und Coryneforme Bakterien und Gram-negative Bakterien wie z.B. Neisseria und Enterobakterien, und eukaryotische Mikroorganismen umfassend Pilze, dabei vorzugsweise Phycomyceten wie z.B. Phytophthora und Ascomyceten wie z.B. Hefen erhältlich ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die zu analysierenden DNAs mit dem Primer oder dem Primerpaar durch PCR amplifiziert und nachfolgend der Größe nach auf einem Gel aufgetrennt werden.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Gel ein Sequenzgel ist.
5. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß als weiterer Schritt ein Southern Blot durchgeführt wird, und die auf die Membran übertragenen DNAs durch Hybridisierung mit einer Sonde sichtbar gemacht werden.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde der bzw. das in einem der vorstehenden Ansprüche genannte Primer oder Primerpaar ist.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer oder das Primerpaar eine Markierung trägt.
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine nicht-radioaktive Markierung, insbesondere Digoxigenin, Biotin, ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Farbstoff oder eine radioaktive Markierung, insbesondere ^{32}P ist.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer eine der in Tabelle 2 dargestellten Sequenzen aufweist.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer eine Sequenz aufweist, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Fingerprint-Analyse für Biodiversitätsstudien, Studien zur genetischen Verwandtschaft, taxonomische Studien, und insbesondere in der Rechtsmedizin, der Züchtung, im Sortenschutz, im Genbank-Management, in der Diagnostik, in der Populationsgenetik oder für Evolutionsstudien eingesetzt wird.
12. Primer zur Verwendung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Primer eine der in Tabelle 2 dargestellten Sequenzen aufweist oder eine Sequenz aufweist, die mit einer der in Tabelle 1 oder 2 dargestellten Sequenzen überlappt.
13. Kit enthaltend mindestens einen Primer und vorzugsweise mindestens ein Primerpaar, der bzw. das an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisiert oder der/das in einem der Ansprüche 1 bis 12 gekennzeichnet ist.
14. Verwendung von mindestens einem Primer und vorzugsweise mindestens ein Primerpaar, der/das in einem der Ansprüche 1 bis 12 gekennzeichnet ist zur Herstellung eines Kits nach Anspruch 13.
15. Verwendung eines Primers oder Primerpaars, der bzw. das an das in Figur 2b dargestellte copia-ähnliche Element der Kokosnuß hybridisiert zum Nachweis von Rekombinationseignissen bei Kreuzungen, insbesonders in der Tier- und Pflanzenzüchtung.

1/14

A



B

COPIA-ÄHNLICHE KOKOSNUSS-SEQUENZ

FIG. 1

2/14

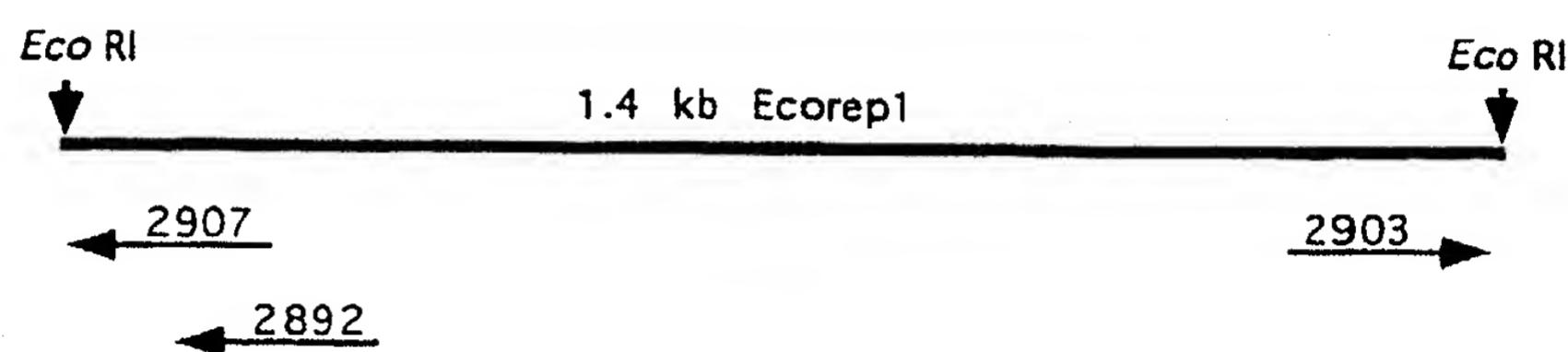
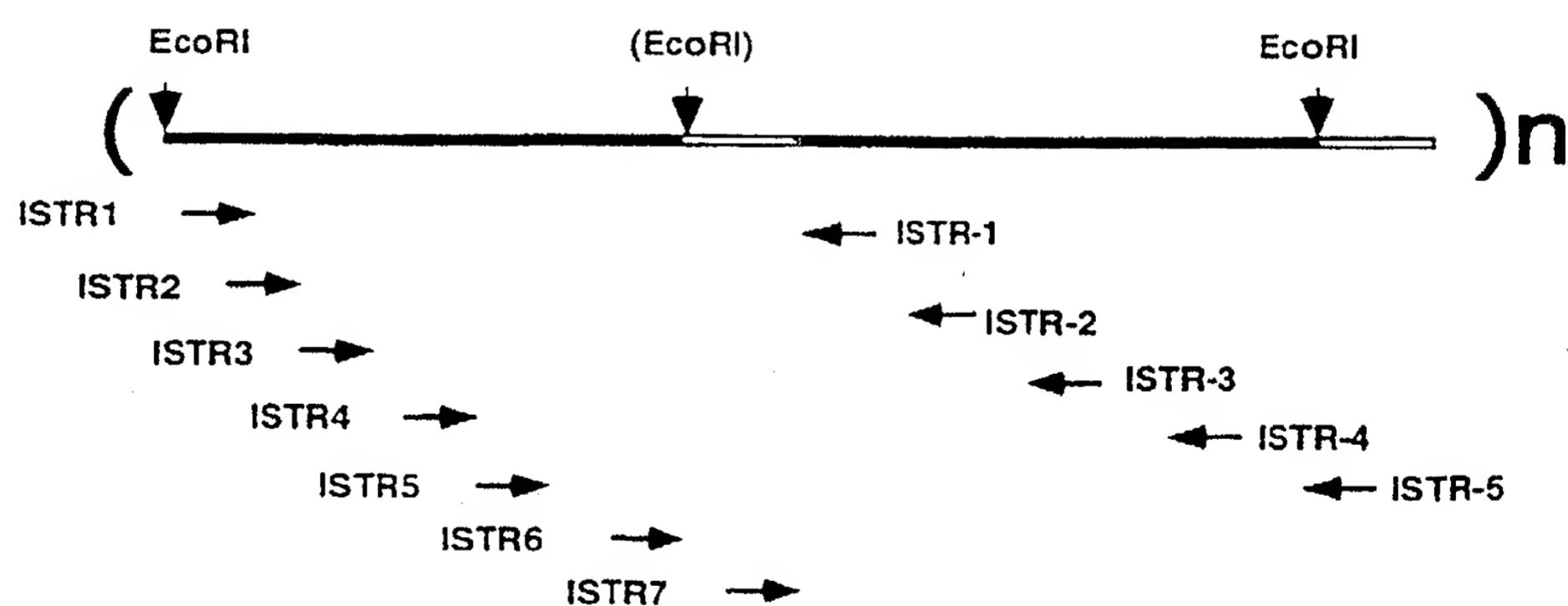
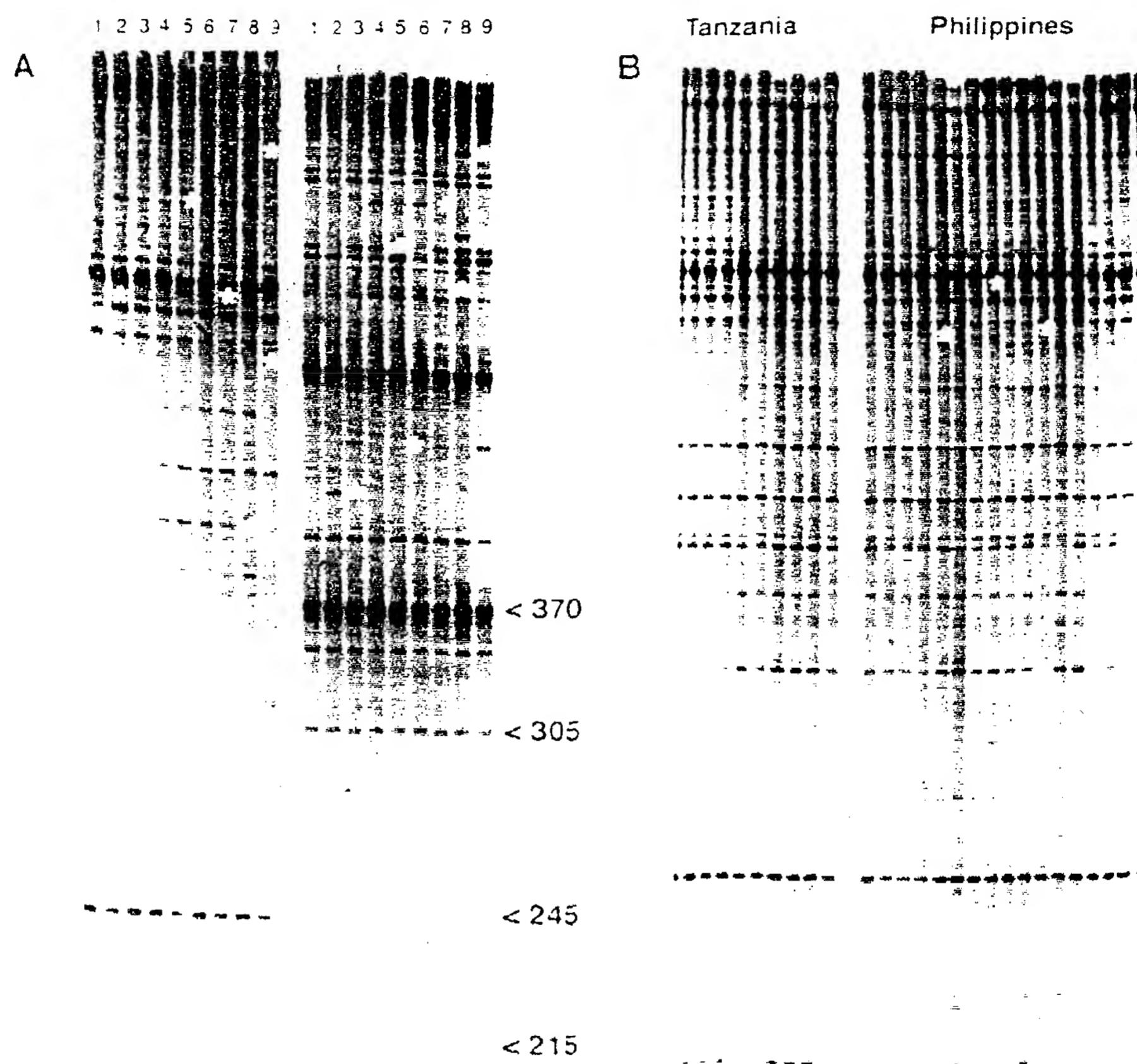
A**B**

FIG. 2

3/14

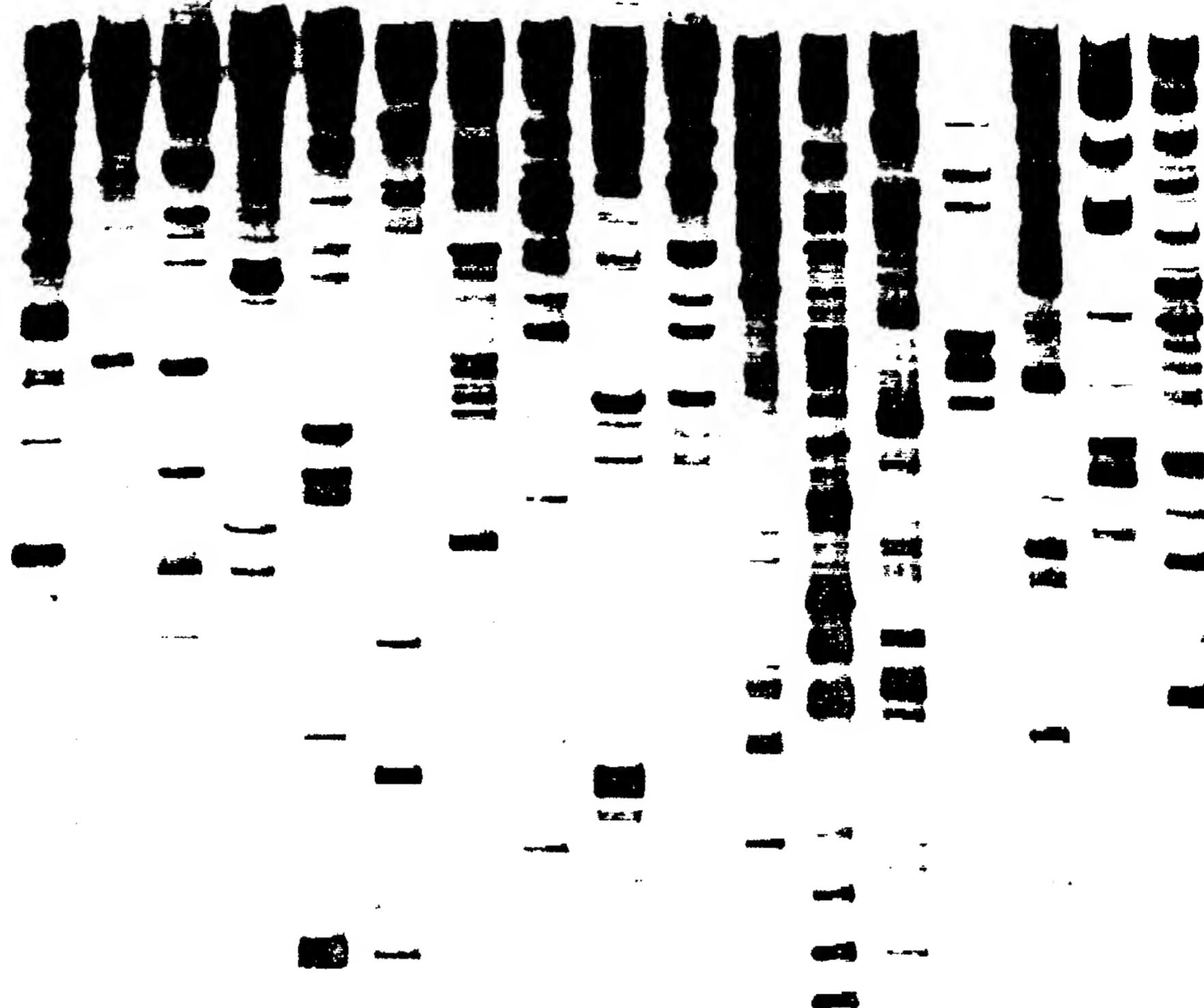
FIG. 3



4/14

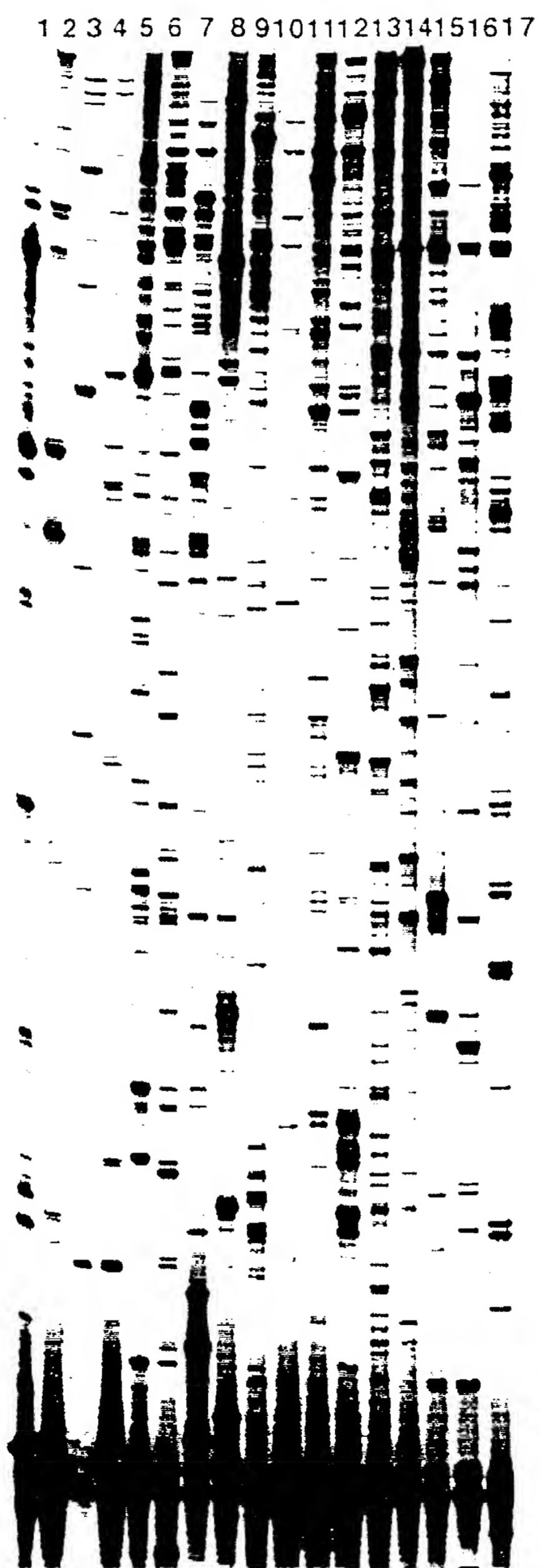
FIG. 4

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



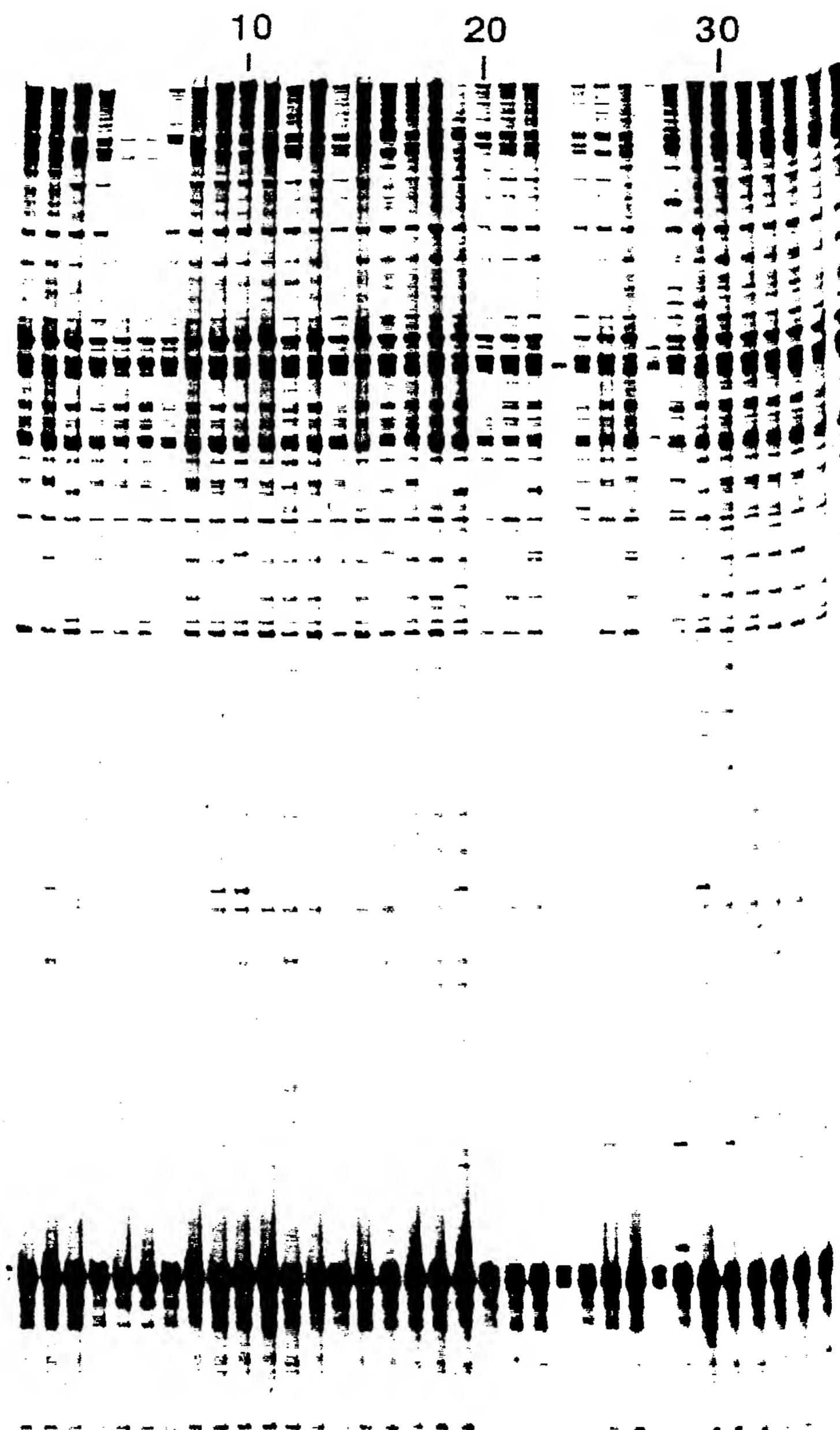
5/14

FIG. 5



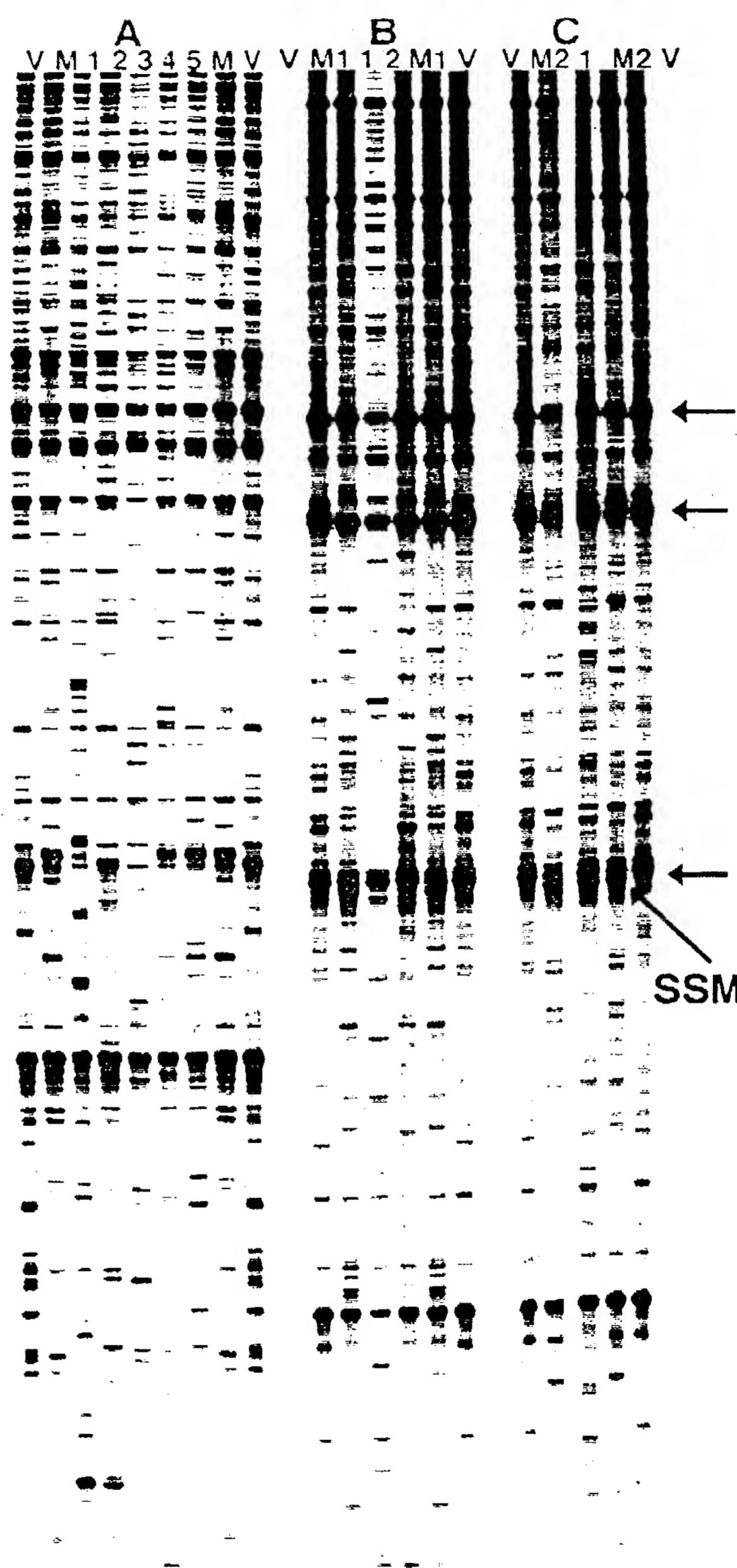
6/14

FIG. 6



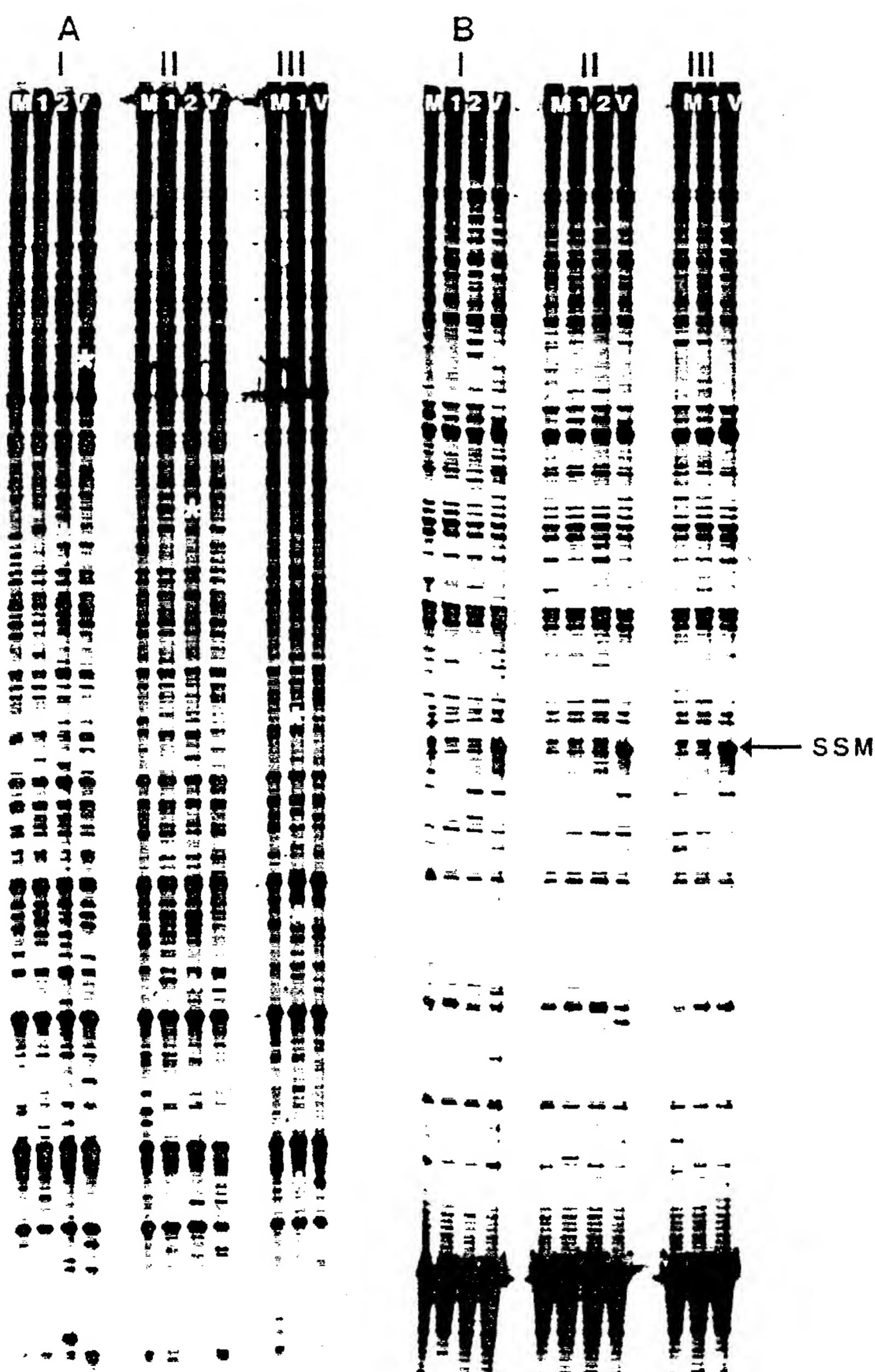
7/14

FIG. 7



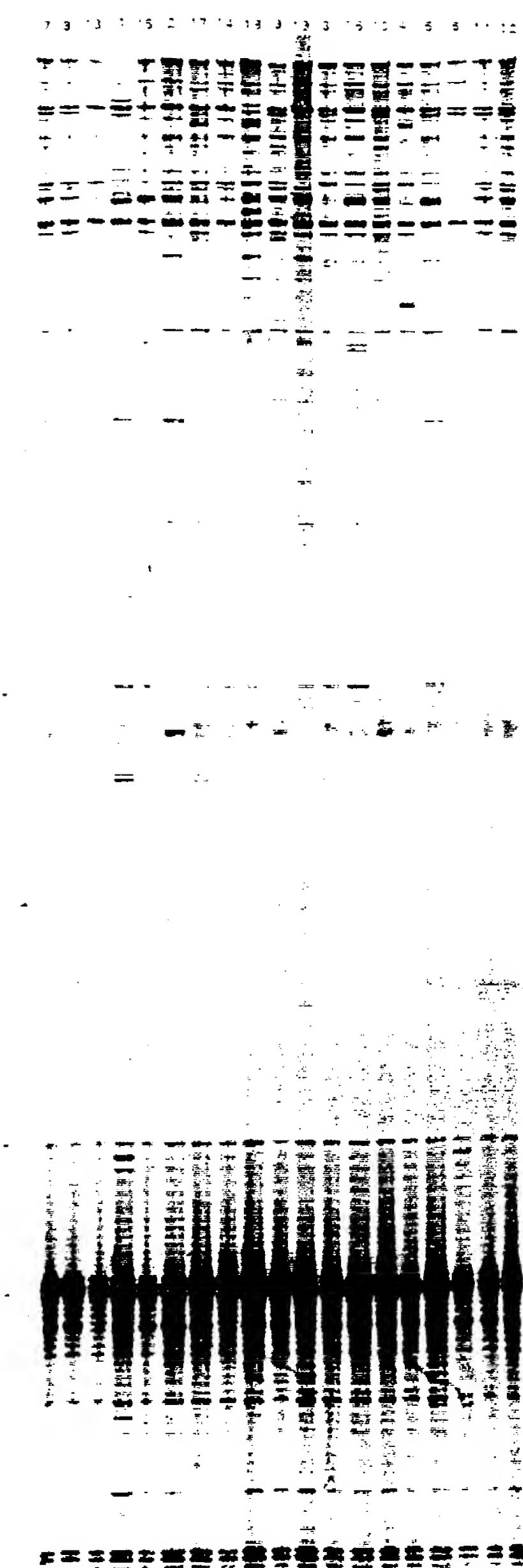
8/14

FIG. 3



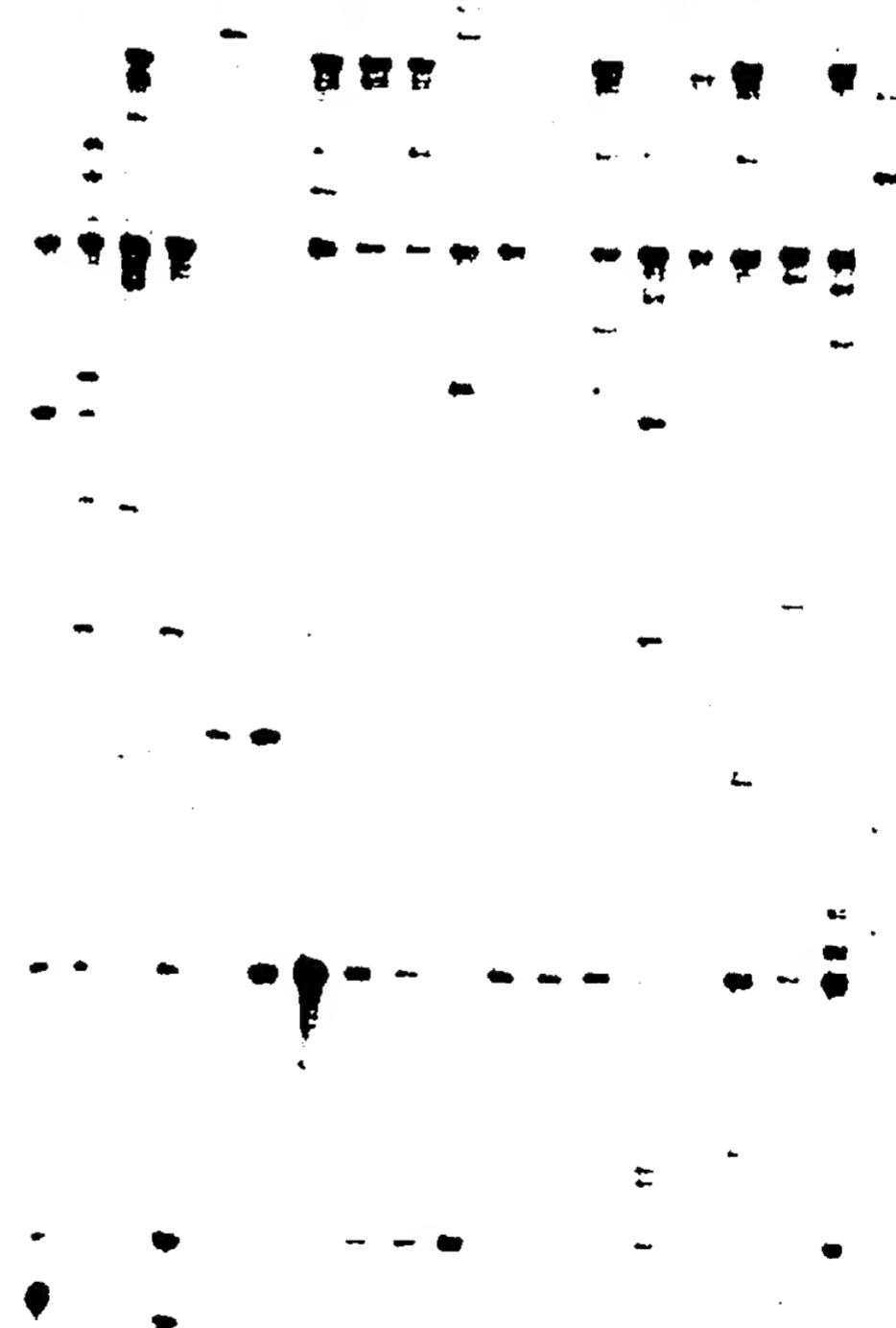
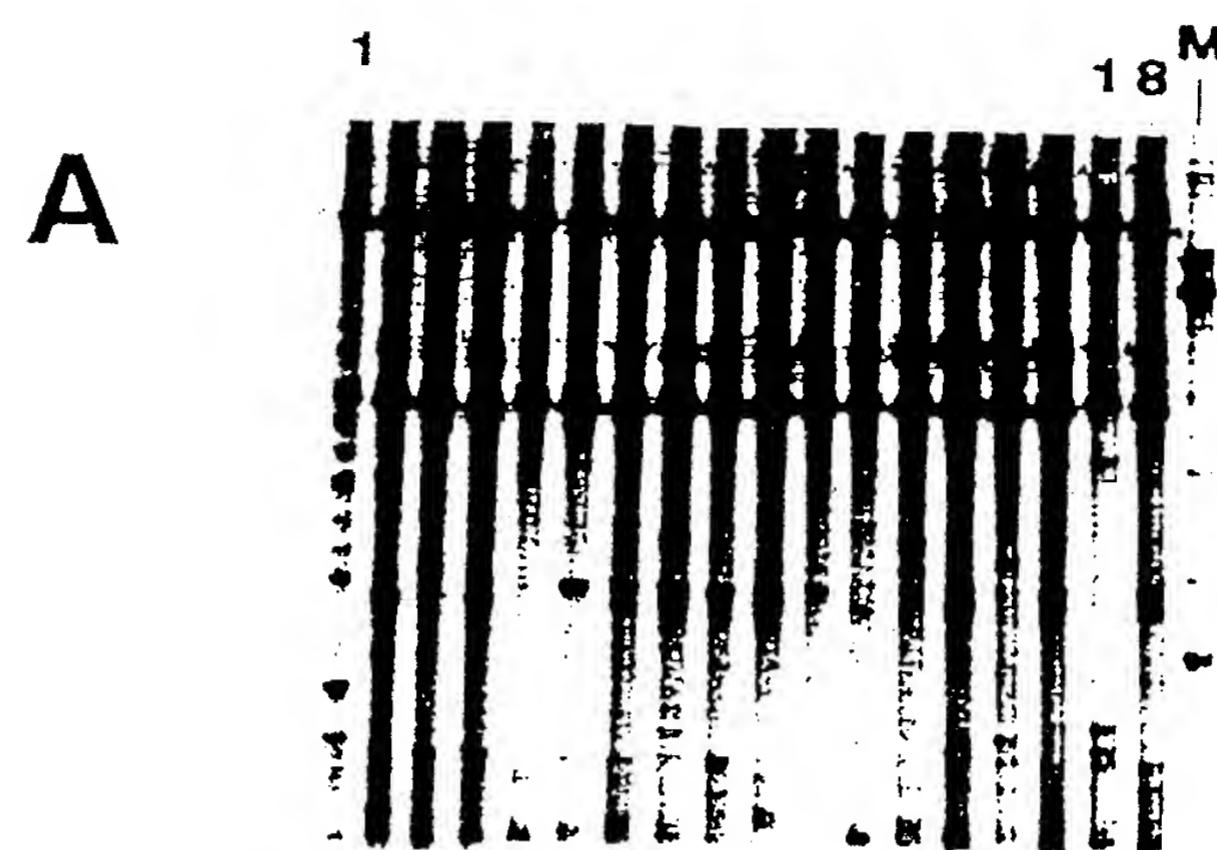
9/14

FIG. 9



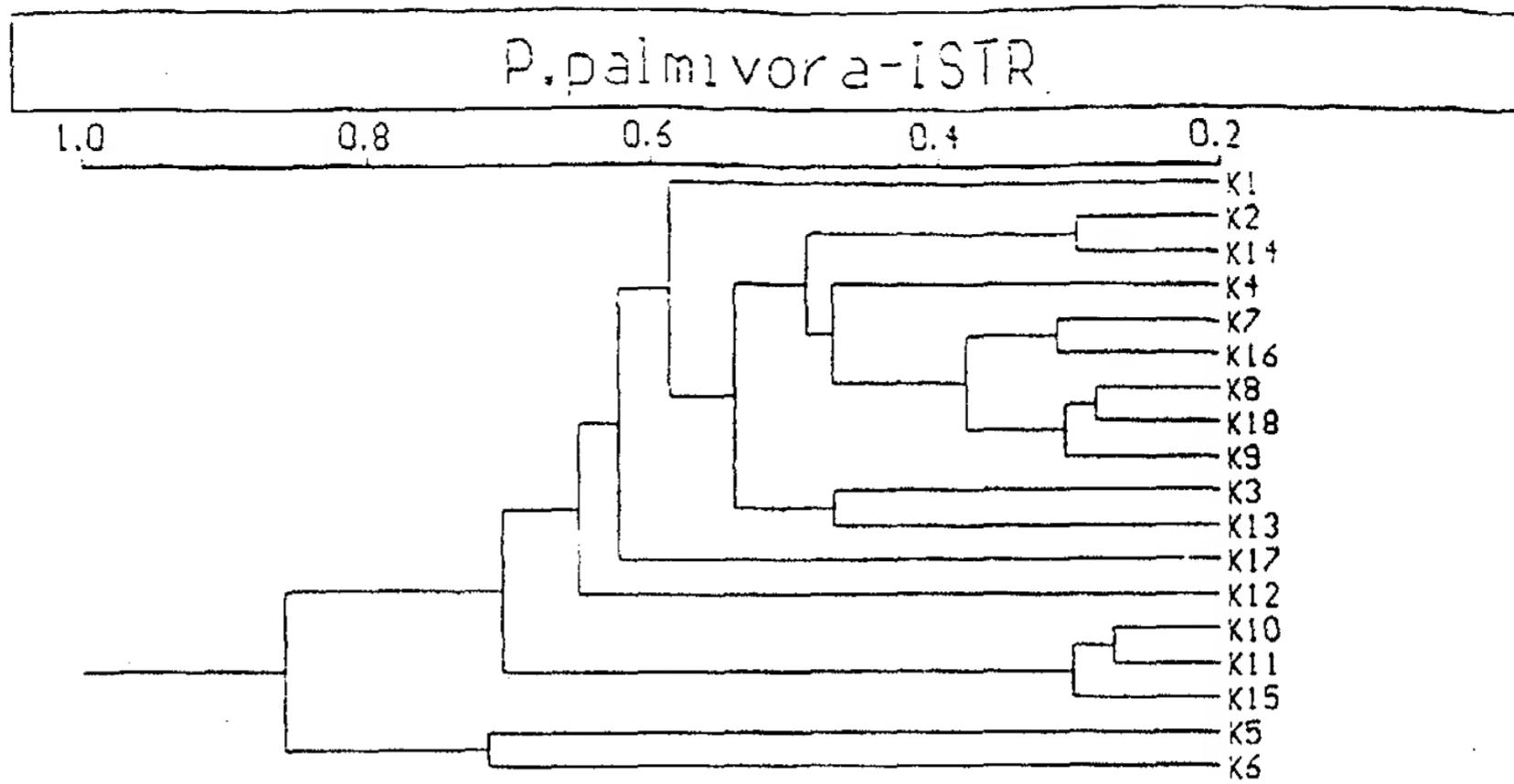
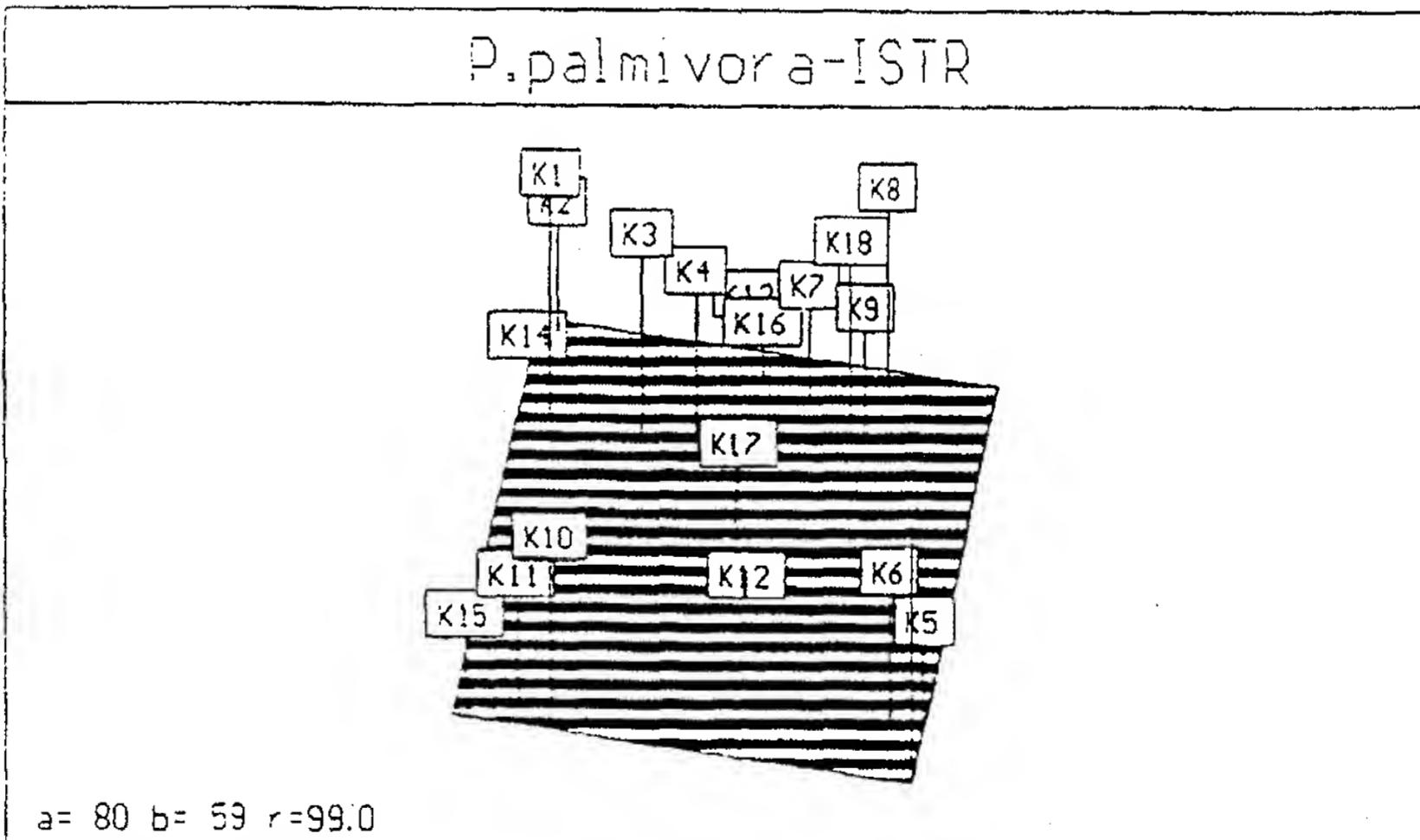
10/14

FIG. 10



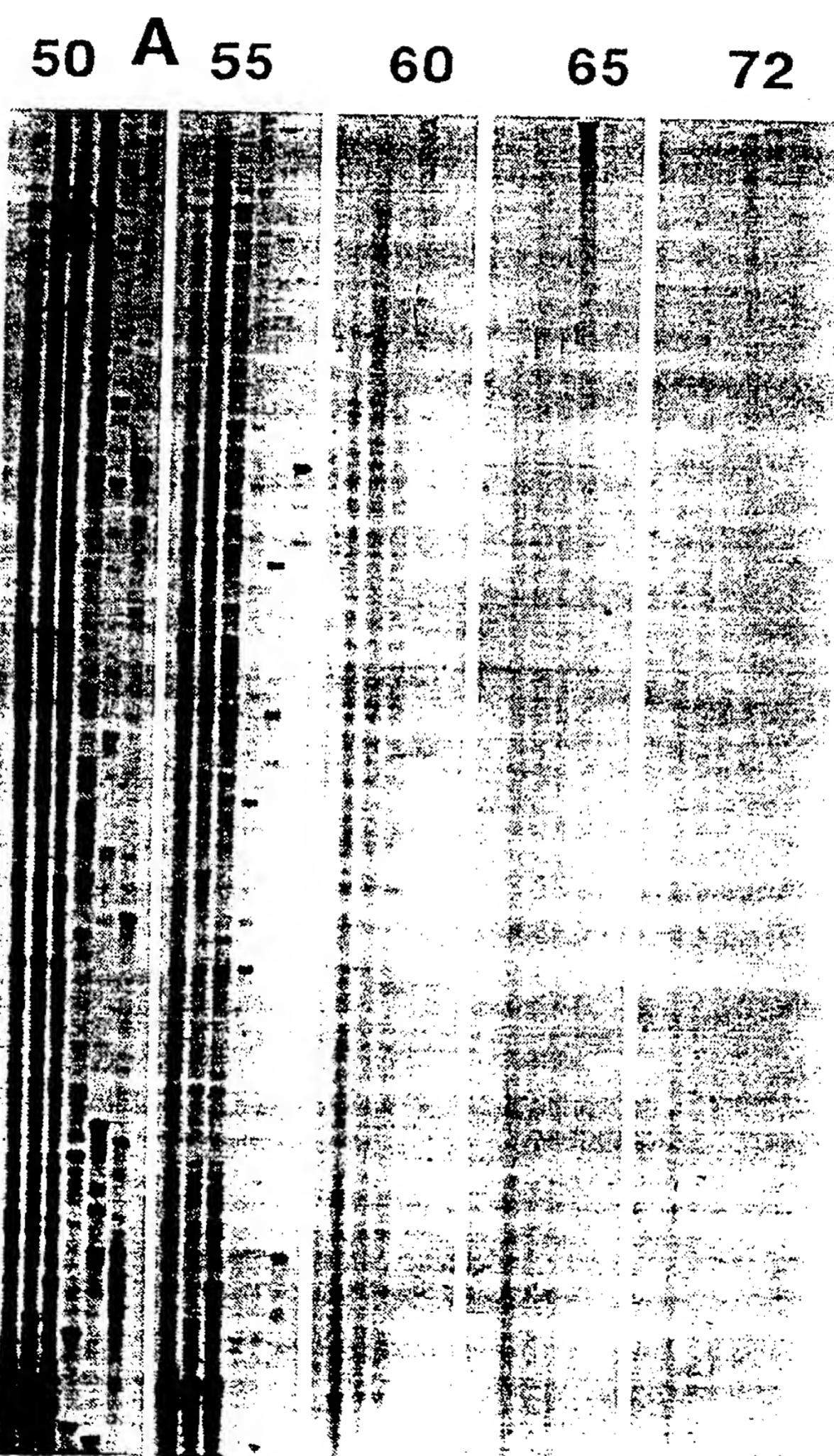
11/14

FIG. 10

B**C**

12/14

Fig. 11A



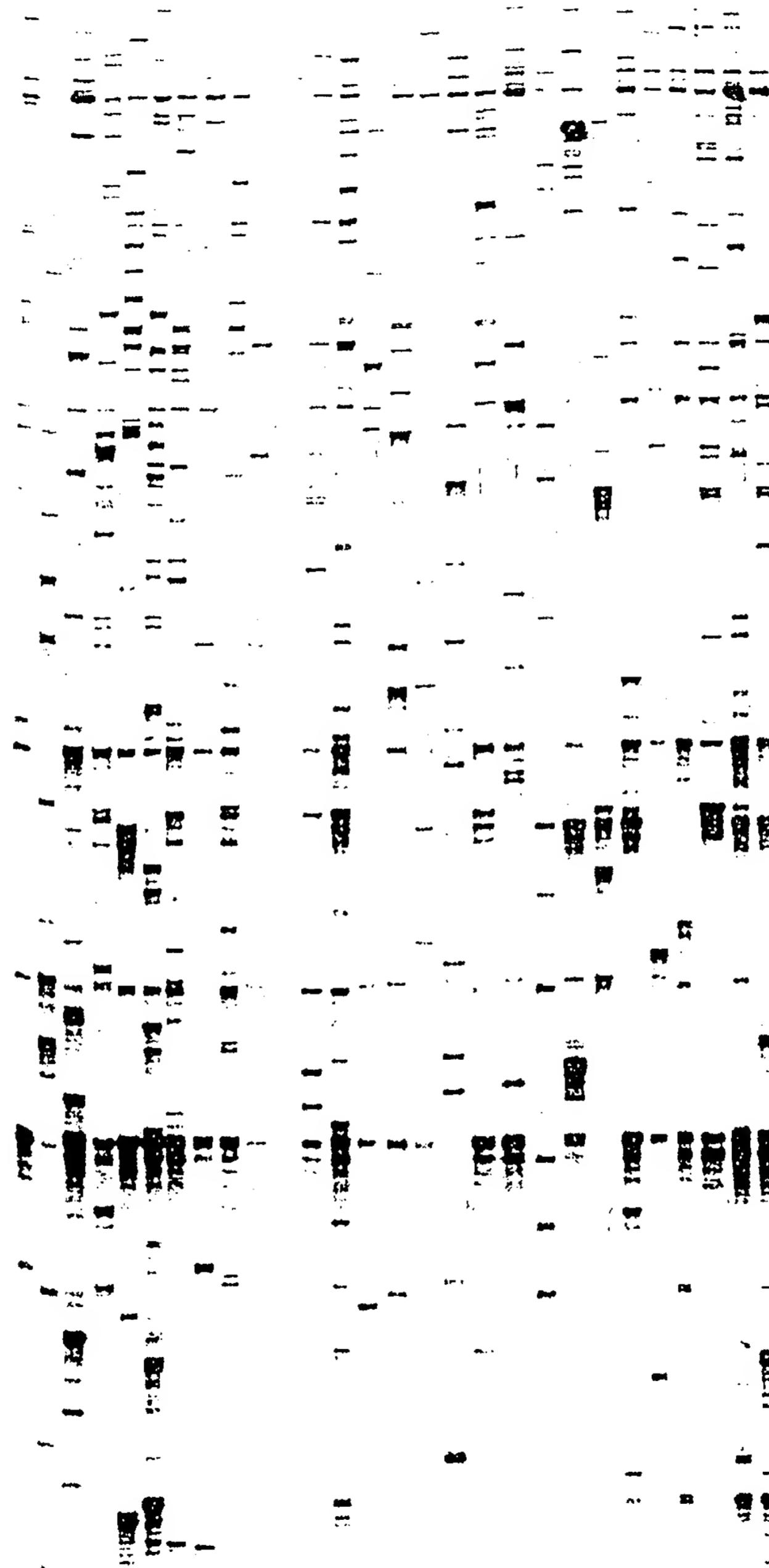
13/14

Fig. 11B



14/14

Fig. 12



RECTIFIED SHEET (RULE 91)
ISA/EP

INTERNAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/04877

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^o	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROHDE W ET AL: "GENOME ANALYSIS OF COCOS NUCIFERA L. BY PCR AMPLIFICATION OF SPACERSEQUENCES SEPARATING A SUBSET OF COPIA-LIKE ECORI REPETITIVE ELEMENTS" JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING, vol. 49, 1995, pages 179-186, XP000677744 cited in the application see the whole document ---	1-15
X	ROHDE W ET AL: "AN ECORI REPETITIVE SEQUENCE FAMILY OF THE COCONUT PALM COCOS NUCIFERA L. SHOWS SEQUENCE HOMOLOGY TO COPIA-LIKE ELEMENTS" JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING, vol. 46, 1992, pages 391-394, XP000677745 cited in the application see the whole document ---	1,7,8, 10,11 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

4 February 1999

11/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

IN NATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/04877

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WELSH J ET AL: "FINGERPRINTING GENOMES USING PCR WITH ARBITRARY PRIMERS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 24, 25 December 1990, pages 7213-7218, XP000310554 see the whole document ----	1-15
A	EP 0 443 748 A (UNIV SINGAPORE) 28 August 1991 ----	1-15
A	WO 93 08297 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 29 April 1993 ansprüche ----	1-15
P,X	WO 97 28278 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;ROHDE WOLFGANG (DE); BECKER DIETER (DE);) 7 August 1997 cited in the application see the whole document ----	1-15

INTERNAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No.

PCT/EP 98/04877

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0443748	A 28-08-1991	AT 130047 T		15-11-1995
		AU 646655 B		03-03-1994
		AU 7027691 A		08-08-1991
		CA 2035813 A		07-08-1991
		DE 69114323 D		14-12-1995
		DE 69114323 T		18-04-1996
		US 5552275 A		03-09-1996
WO 9308297	A 29-04-1993	AU 2931692 A		21-05-1993
		CA 2121696 A		29-04-1993
		EP 0610396 A		17-08-1994
		US 5691136 A		25-11-1997
		US 5523217 A		04-06-1996
WO 9728278	A 07-08-1997	AU 1720497 A		22-08-1997
		EP 0879300 A		25-11-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. Aktenzeichen
PCT/EP 98/04877

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ROHDE W ET AL: "GENOME ANALYSIS OF COCOS NUCIFERA L. BY PCR AMPLIFICATION OF SPACERSEQUENCES SEPARATING A SUBSET OF COPIA-LIKE ECOLI REPETITIVE ELEMENTS" JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING, Bd. 49, 1995, Seiten 179-186, XP000677744 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-15
X	ROHDE W ET AL: "AN ECOLI REPETITIVE SEQUENCE FAMILY OF THE COCONUT PALM COCOS NUCIFERA L. SHOWS SEQUENCE HOMOLOGY TO COPIA-LIKE ELEMENTS" JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING, Bd. 46, 1992, Seiten 391-394, XP000677745 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,7,8, 10,11
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

4. Februar 1999

11/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, F

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04877

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WELSH J ET AL: "FINGERPRINTING GENOMES USING PCR WITH ARBITRARY PRIMERS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 18, Nr. 24, 25. Dezember 1990, Seiten 7213-7218, XP000310554 siehe das ganze Dokument ---	1-15
A	EP 0 443 748 A (UNIV SINGAPORE) 28. August 1991 ---	1-15
A	WO 93 08297 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 29. April 1993 ansprüche ---	1-15
P,X	WO 97 28278 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;ROHDE WOLFGANG (DE); BECKER DIETER (DE);) 7. August 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-15

INTERNATIONALER RECH HENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern	Europäisches Aktenzeichen
PCT/EP 98/04877	

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0443748	A	28-08-1991	AT	130047 T	15-11-1995
			AU	646655 B	03-03-1994
			AU	7027691 A	08-08-1991
			CA	2035813 A	07-08-1991
			DE	69114323 D	14-12-1995
			DE	69114323 T	18-04-1996
			US	5552275 A	03-09-1996
WO 9308297	A	29-04-1993	AU	2931692 A	21-05-1993
			CA	2121696 A	29-04-1993
			EP	0610396 A	17-08-1994
			US	5691136 A	25-11-1997
			US	5523217 A	04-06-1996
WO 9728278	A	07-08-1997	AU	1720497 A	22-08-1997
			EP	0879300 A	25-11-1998